

## PCT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION  
(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Commissioner  
US Department of Commerce  
United States Patent and Trademark  
Office, PCT  
2011 South Clark Place Room  
CP2/5C24  
Arlington, VA 22202  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 30 October 2000 (30.10.00)	Commissioner US Department of Commerce United States Patent and Trademark Office, PCT 2011 South Clark Place Room CP2/5C24 Arlington, VA 22202 ETATS-UNIS D'AMERIQUE
International application No. PCT/JP00/01289	Applicant's or agent's file reference K4-004PCT
International filing date (day/month/year) 03 March 2000 (03.03.00)	Priority date (day/month/year) 03 March 1999 (03.03.99)
Applicant YAMADA, Haruki et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:

14 September 2000 (14.09.00)

in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

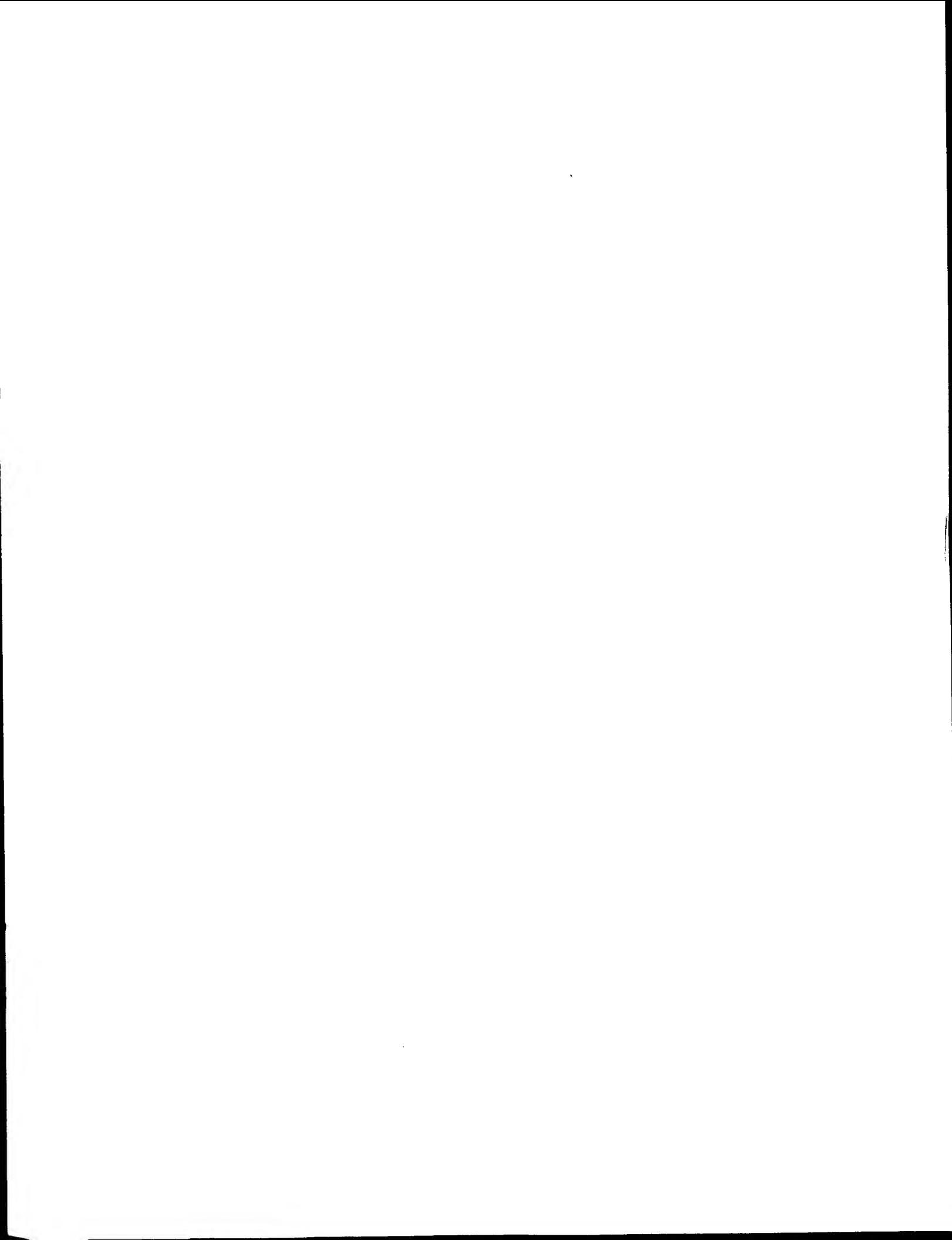
\_\_\_\_\_

2. The election  was

was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland  Facsimile No.: (41-22) 740.14.35	Authorized officer R. Forax  Telephone No.: (41-22) 338.83.38
---	--



Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

9/9/4705

Applicant's or agent's file reference <b>K4-004PCT</b>	<b>FOR FURTHER ACTION</b> SeeNotificationofTransmittalofInternational Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. <b>PCT/JP00/01289</b>	International filing date (day/month/year) <b>03 March 2000 (03.03.00)</b>	Priority date (day/month/year) <b>03 March 1999 (03.03.99)</b>
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC <b>A61K 39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/21, 39/10, 39/05, 39/106, 39/108, 39/118, 39/00, 39/012, 39/015, A61P 31/14, 31/16, 31/18, 31/20, 31/04, 33/06, 33/02, 33/12, 33/10, 33/00</b>		
Applicant <b>THE KITASATO INSTITUTE</b>		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>6</u> sheets, including this cover sheet.
<input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand <b>14 September 2000 (14.09.00)</b>	Date of completion of this report <b>01 June 2001 (01.06.2001)</b>
Name and mailing address of the IPEA/JP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/JP00/01289

## I. Basis of the report

1. With regard to the **elements** of the international application:\* the international application as originally filed the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the claims:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19)

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the drawings:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

 the sequence listing part of the description:

pages \_\_\_\_\_, as originally filed

pages \_\_\_\_\_, filed with the demand

pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

2. With regard to the **language**, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item. These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is: the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)). the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)). the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing: contained in the international application in written form. filed together with the international application in computer readable form. furnished subsequently to this Authority in written form. furnished subsequently to this Authority in computer readable form. The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished. The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.4.  The amendments have resulted in the cancellation of: the description, pages \_\_\_\_\_ the claims, Nos. \_\_\_\_\_ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_5.  This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.



**III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability**

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

the entire international application.  
 claims Nos. 9,10

because:

the said international application, or the said claims Nos. 9,10  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

See supplemental sheet for continuation of Box III. 1.

the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

the claims, or said claims Nos. \_\_\_\_\_ are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.  
 no international search report has been established for said claims Nos. 9,10

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

the written form has not been furnished or does not comply with the standard.  
 the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

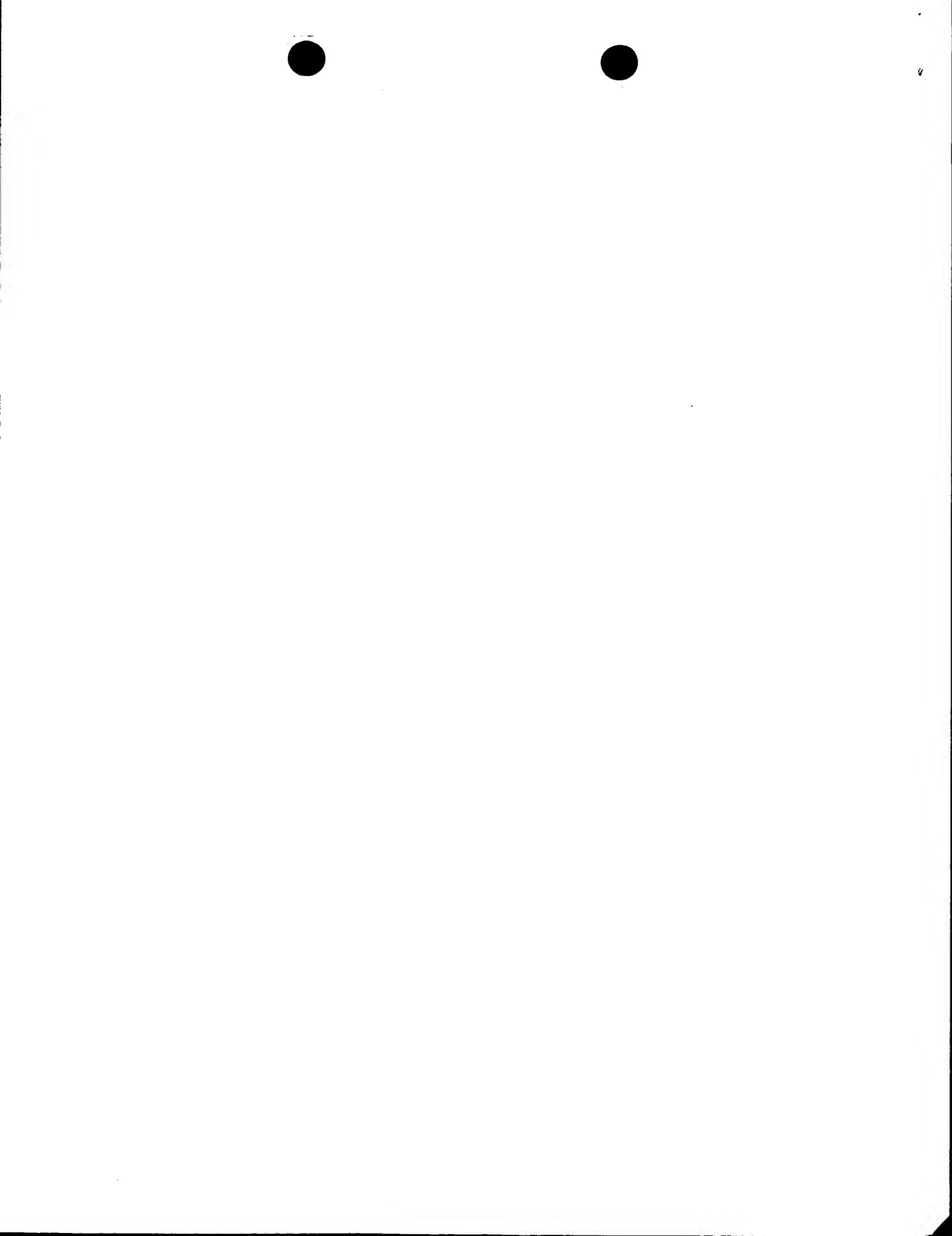


**INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT**International application No.  
[REDACTED] /JP 00/01289**Supplemental Box**

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III. 1.

Claims 9 and 10 pertain to methods for treatment of the human body by therapy, and thus relate to subject matter which does not require international preliminary examination by this International Preliminary Examining Authority, under the provisions of PCT Article 34(4)(a)(i) and PCT Rule 67.1(iv).



## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/JP 00/01289

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	2-4	YES
	Claims	1, 5-8	NO
Inventive step (IS)	Claims	6	YES
	Claims	1-5, 7, 8	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-8	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

Claims 1 and 5-8 relate to adjuvants including an unsaturated hydroxy fatty acid or derivative thereof and to vaccine preparations which contain said adjuvant as a constituent with an influenza viral antigen as an immunogen; however, this is not novel, because Document 1 (WO, 96/00609, A1 (Société d'Exploitation de Produits pour les Industries Chimiques-SEPPIC), 24 October 1996 (24.10.96) & FR, 2733151, A1 & EP, 825875, A1 & JP, 11-503743, A); Claim 13 and page 7, line 4 from the bottom to page 9, line 25, and especially page 9, line 2) discloses an adjuvant including an unsaturated hydroxy fatty acid or derivative thereof and vaccines which contain said adjuvant as a constituent, with an influenza viral antigen as an immunogen.

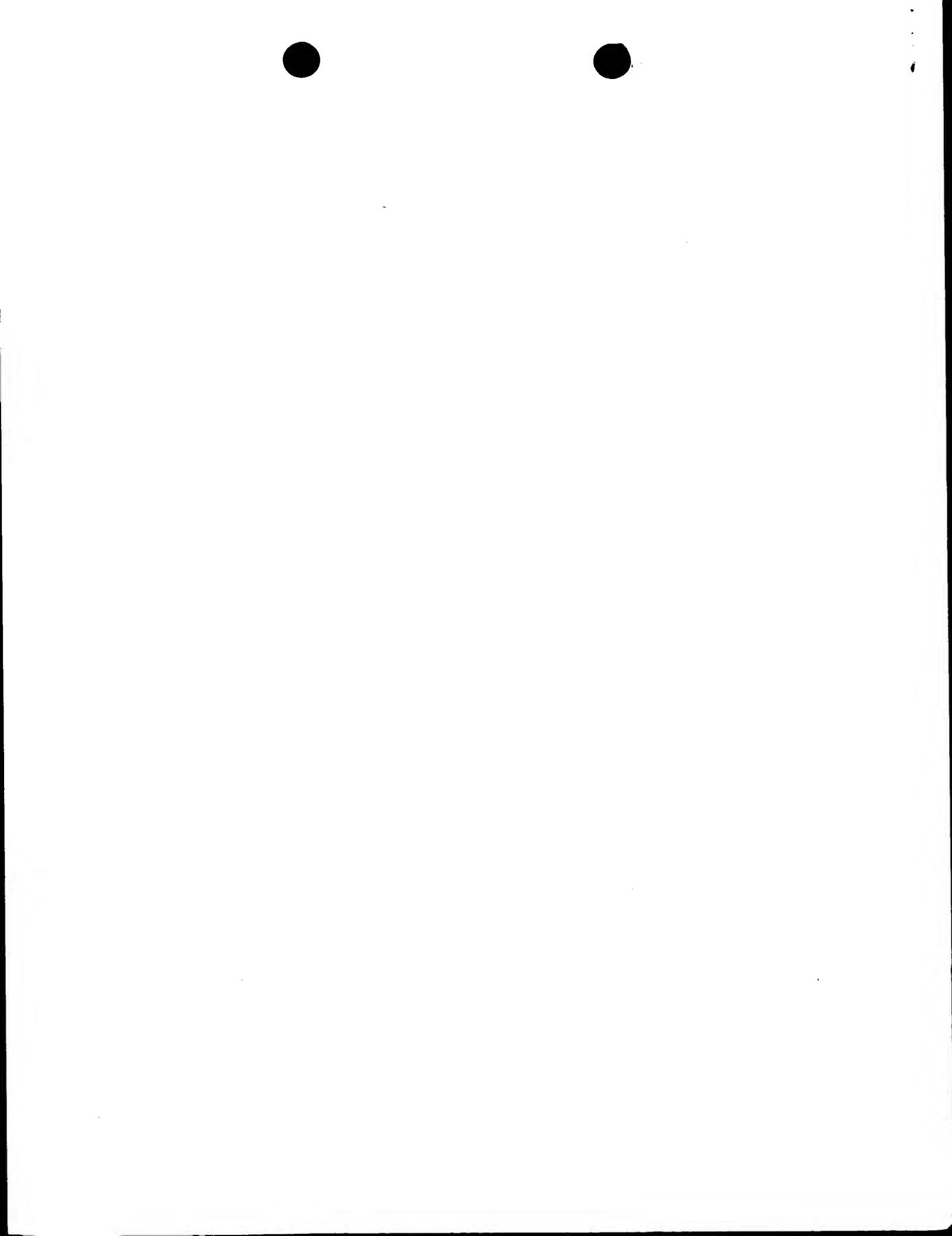
Claims 1-5, 7 and 8 mention that the unsaturated hydroxy fatty acid is 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid or a derivative thereof, and embrace vaccine preparations which include a broad range of immunogens other than an influenza virus, which are not mentioned in Document 1.

However, Document 2 (JP, 7-173069, A (Tsumura & Co.), 11 July 1995 (11.07.95) (Family: none); complete document) and Document 3 (Haruki Yamada et al., "In vivo antiinfluenza virus activity of kampo medicine sho-seiryu-



to through mucosal immune system", Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol, 1998, Vol. 20, No. 3, pp. 185-192; complete document) disclose sho-seiryu-to as an adjuvant, and Document 4 (Masao Maruno, "Research for active principles of Pinelliae tuber and new preparation of crude drug", Journal of Traditional Medicines, 1997, Vol. 14, pp. 81-88; abstract and Fig. 2) discloses the unsaturated hydroxy fatty acid 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid as a constituent of pinellia tuber, which is a component of sho-seiryu-to, and in the pharmaceutical field it is common practice to identify single specially active ingredients within compositions having a certain activity. Therefore, given the disclosure of the adjuvant effect of the hydroxy unsaturated fatty acids in Document 1 a person skilled in the art could easily predict and confirm that among the constituents of pinellia tuber, a component of sho-seiryu-to which acts an adjuvant as indicated in Document 4, the unsaturated hydroxy fatty acid 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid acts as an adjuvant. Moreover, Document 5 (WO, 96/06627, A1 (The Administrators of the Tulane Educational Fund), 7 March 1996 (07.03.96) & US, 6019982, A & EP, 777490, A1 & JP, 10-505059, A; claims) and Document 6 (JP, 5-9130, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 19 January 1993 (19.01.93) (Family: none); claims and paragraph [0002]) disclose vaccines which contain an adjuvant and a broad range of immunogens. A person skilled in the art could thus easily conceive of using the aforementioned unsaturated hydroxy fatty acid adjuvant in vaccine preparations containing a broad range of antigens.

Therefore, Claims 1-5, 7 and 8 do not involve an inventive step.



## 特許協力条約

PCT

## 国際予備審査報告

REC'D 22 JUN 2001

WIPO PCT

(法第12条、法施行規則第56条)  
〔PCT 36条及びPCT規則70〕

出願人又は代理人 の書類記号 K4-004 PCT	今後の手続きについては、国際予備審査報告の送付通知（様式PCT/IPEA/416）を参照すること。	
国際出願番号 PCT/JP00/01289	国際出願日 (日.月.年) 03.03.00	優先日 (日.月.年) 03.03.99
国際特許分類 (IPC) Int.Cl <sup>7</sup> A61K39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/21, 39/10, 39/05, 39/106, 39/108, 39/118, 39/00, 39/012, 39-015, A61P31/14, 31/16, 31/18, 31/20, 31/04, 33/06, 33/02, 33/12, 33/10, 33/00		
出願人（氏名又は名称） 社団法人 北里研究所		

1. 国際予備審査機関が作成したこの国際予備審査報告を法施行規則第57条（PCT 36条）の規定に従い送付する。

2. この国際予備審査報告は、この表紙を含めて全部で 5 ページからなる。

この国際予備審査報告には、附属書類、つまり補正されて、この報告の基礎とされた及び／又はこの国際予備審査機関に対して訂正を含む明細書、請求の範囲及び／又は図面も添付されている。  
(PCT規則70.16及びPCT実施細則第607号参照)  
この附属書類は、全部で        ページである。

3. この国際予備審査報告は、次の内容を含む。

- I  国際予備審査報告の基礎
- II  優先権
- III  新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成
- IV  発明の単一性の欠如
- V  PCT 35条(2)に規定する新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての見解、それを裏付けるための文献及び説明
- VI  ある種の引用文献
- VII  国際出願の不備
- VIII  国際出願に対する意見

国際予備審査の請求書を受理した日 14.09.00	国際予備審査報告を作成した日 01.06.01
名称及びあて先 日本国特許庁 (IPEA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官（権限のある職員） 瀧原下浩一 電話番号 03-3581-1101 内線 3452
	4C 9284



## I. 国際予備審査報告の基礎

1. この国際予備審査報告は下記の出願書類に基づいて作成された。(法第6条(PCT14条)の規定に基づく命令に応答するために提出された差し替え用紙は、この報告書において「出願時」とし、本報告書には添付しない。PCT規則70.16, 70.17)

 出願時の国際出願書類

<input type="checkbox"/> 明細書 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 請求の範囲 第 _____	項、	出願時に提出されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	PCT19条の規定に基づき補正されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
請求の範囲 第 _____	項、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 図面 第 _____	ページ/図、	出願時に提出されたもの
図面 第 _____	ページ/図、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
図面 第 _____	ページ/図、	付の書簡と共に提出されたもの
<input type="checkbox"/> 明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	出願時に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	国際予備審査の請求書と共に提出されたもの
明細書の配列表の部分 第 _____	ページ、	付の書簡と共に提出されたもの

2. 上記の出願書類の言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願の言語である。

上記の書類は、下記の言語である \_\_\_\_\_ 語である。

- 国際調査のために提出されたPCT規則23.1(b)にいう翻訳文の言語
- PCT規則48.3(b)にいう国際公開の言語
- 国際予備審査のために提出されたPCT規則55.2または55.3にいう翻訳文の言語

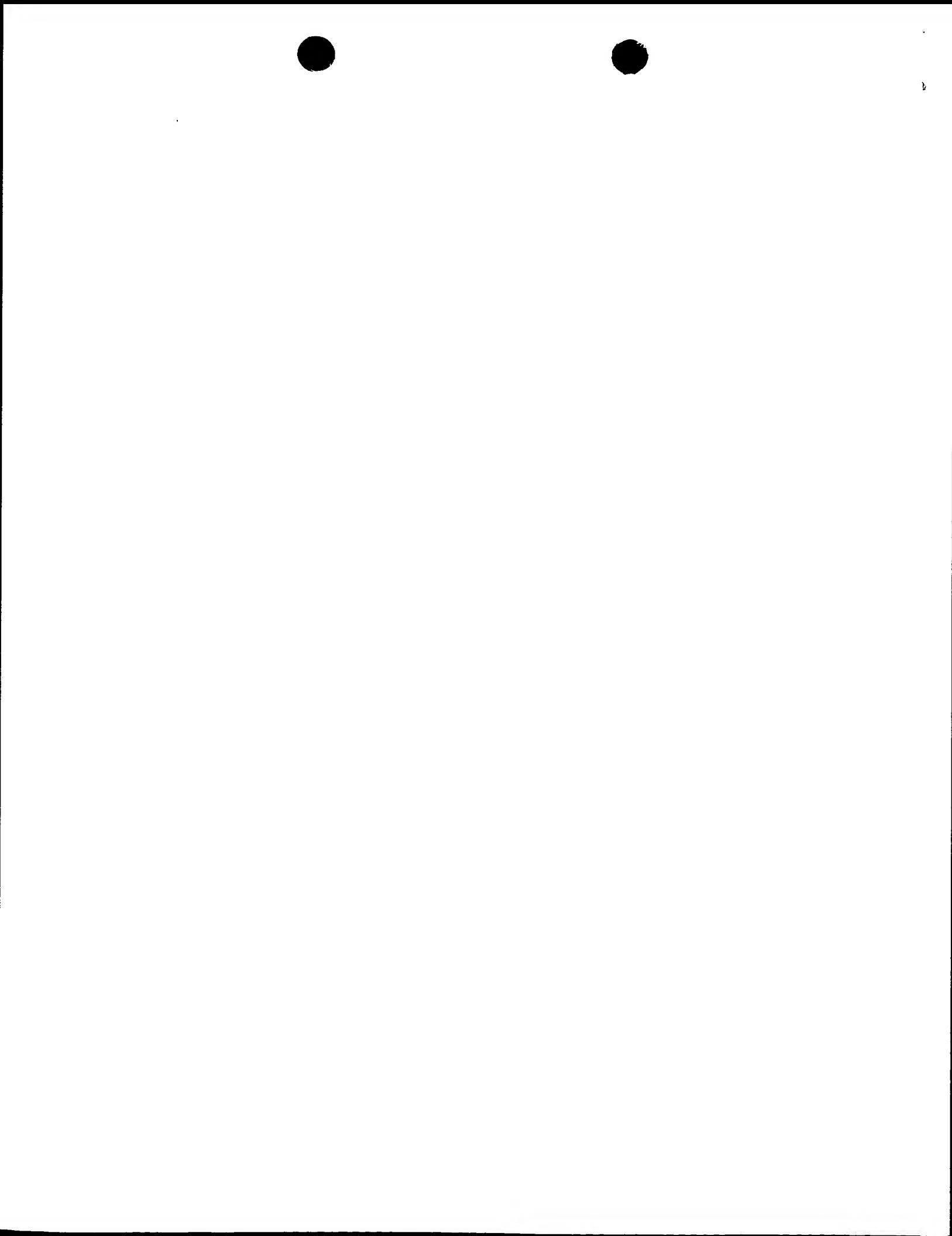
3. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際予備審査報告を行った。

- この国際出願に含まれる書面による配列表
- この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出された書面による配列表
- 出願後に、この国際予備審査（または調査）機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表
- 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった
- 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

4. 補正により、下記の書類が削除された。

- 明細書 第 \_\_\_\_\_ ページ
- 請求の範囲 第 \_\_\_\_\_ 項
- 図面 図面の第 \_\_\_\_\_ ページ/図

5.  この国際予備審査報告は、補充欄に示したように、補正が出願時における開示の範囲を越えてされたものと認められるので、その補正がされなかつたものとして作成した。(PCT規則70.2(c) この補正を含む差し替え用紙は上記1.における判断の際に考慮しなければならず、本報告に添付する。)



## III. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての国際予備審査報告の不作成

1. 次に関して、当該請求の範囲に記載されている発明の新規性、進歩性又は産業上の利用可能性につき、次の理由により審査しない。

国際出願全体  
 請求の範囲 9, 10

理由：

この国際出願又は請求の範囲 9, 10 は、国際予備審査をすることを要しない次の事項を内容としている（具体的に記載すること）。

請求の範囲 9, 10 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT 34条(4)(a)(i)及びPCT規則67.1(iv)の規定により、この国際予備審査機関が予備審査をすることを要しない対象に係るものである。

明細書、請求の範囲若しくは図面（次に示す部分）又は請求の範囲 の記載が、不明確であるため、見解を示すことができない（具体的に記載すること）。

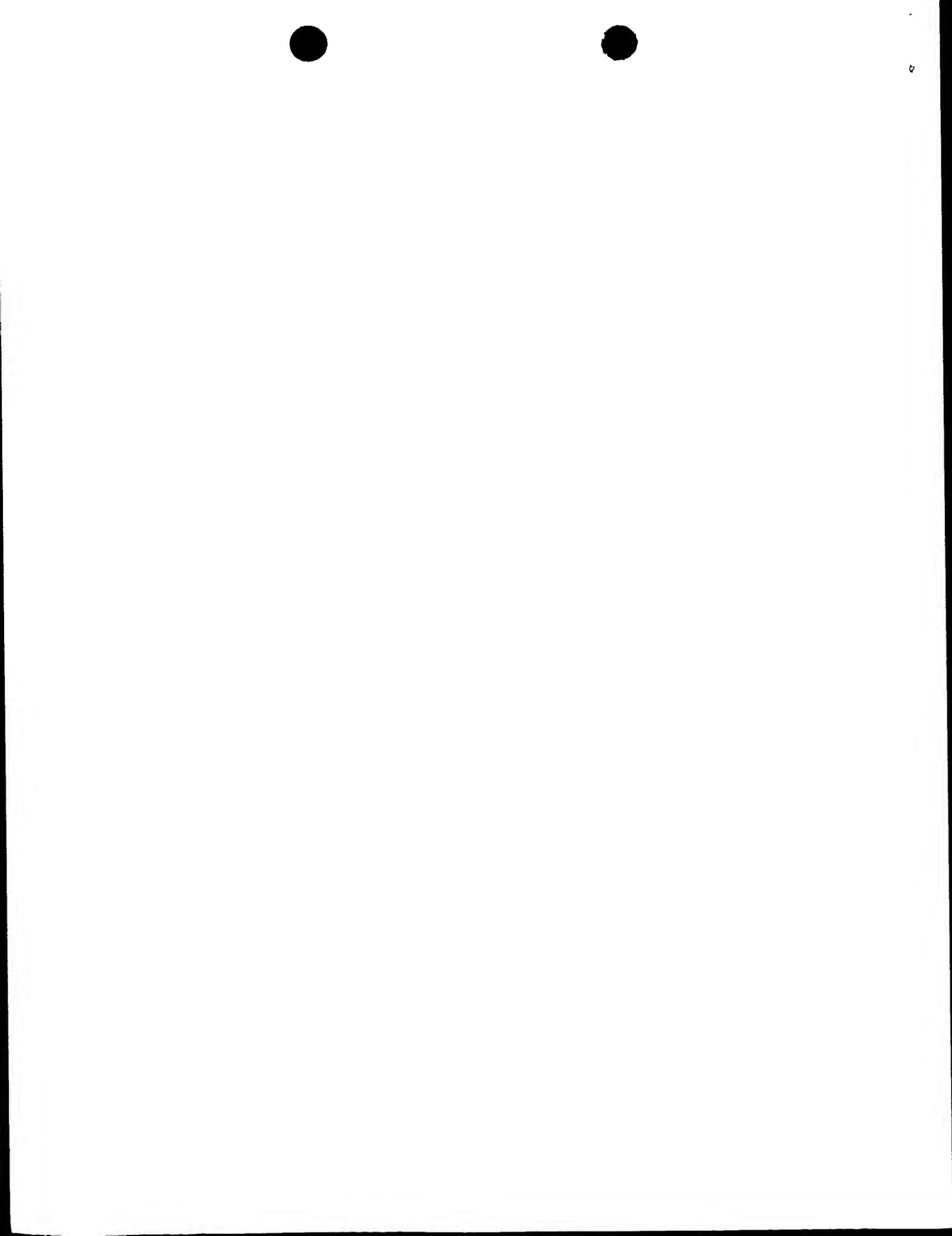
全部の請求の範囲又は請求の範囲 が、明細書による十分な裏付けを欠くため、見解を示すことができない。

請求の範囲 9, 10 について、国際調査報告が作成されていない。

2. ヌクレオチド又はアミノ酸の配列表が実施細則の附属書C（塩基配列又はアミノ酸配列を含む明細書等の作成のためのガイドライン）に定める基準を満たしていないので、有効な国際予備審査をすことができない。

書面による配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。

フレキシブルディスクによる配列表が提出されていない又は所定の基準を満たしていない。



V. 新規性、進歩性又は産業上の利用可能性についての法第12条 (PCT35条(2)) に定める見解、それを裏付ける文献及び説明

## 1. 見解

新規性 (N)	請求の範囲	2-4	有
	請求の範囲	1, 5-8	無

進歩性 (I S)	請求の範囲	6	有
	請求の範囲	1-5, 7, 8	無

産業上の利用可能性 (I A)	請求の範囲	1-8	有
	請求の範囲		無

## 2. 文献及び説明 (PCT規則70.7)

請求の範囲1, 5-8は、ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体を含むアジュバント、免疫原成分としてインフルエンザウイルス抗原を含み、該アジュバントを構成成分とするワクチン製剤に関するものであるが、文献1 (WO, 96/00609, A1 (SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES-SEPPIC) 24. 10月. 1996 (24. 10. 96) & FR, 2733151, A1&EP, 825875, A1&JP, 11-503743, A) のCLAIM13, 第7ページ下から4行—第9ページ第25行、特に、第9ページ第2行には、ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体を含むアジュバント、免疫原成分としてインフルエンザウイルス抗原を含み、該アジュバントを構成成分とするワクチン製剤が記載されているから、新規性を有しない。

請求の範囲1-5, 7, 8は、ヒドロキシ不飽和脂肪酸が9, 12, 13-トリヒドロキシ-10E-オクタデセン酸またはその誘導体であるもの、インフルエンザウイルス以外の広範な免疫原を含むワクチン製剤を包含するが、文献1に記載はない。

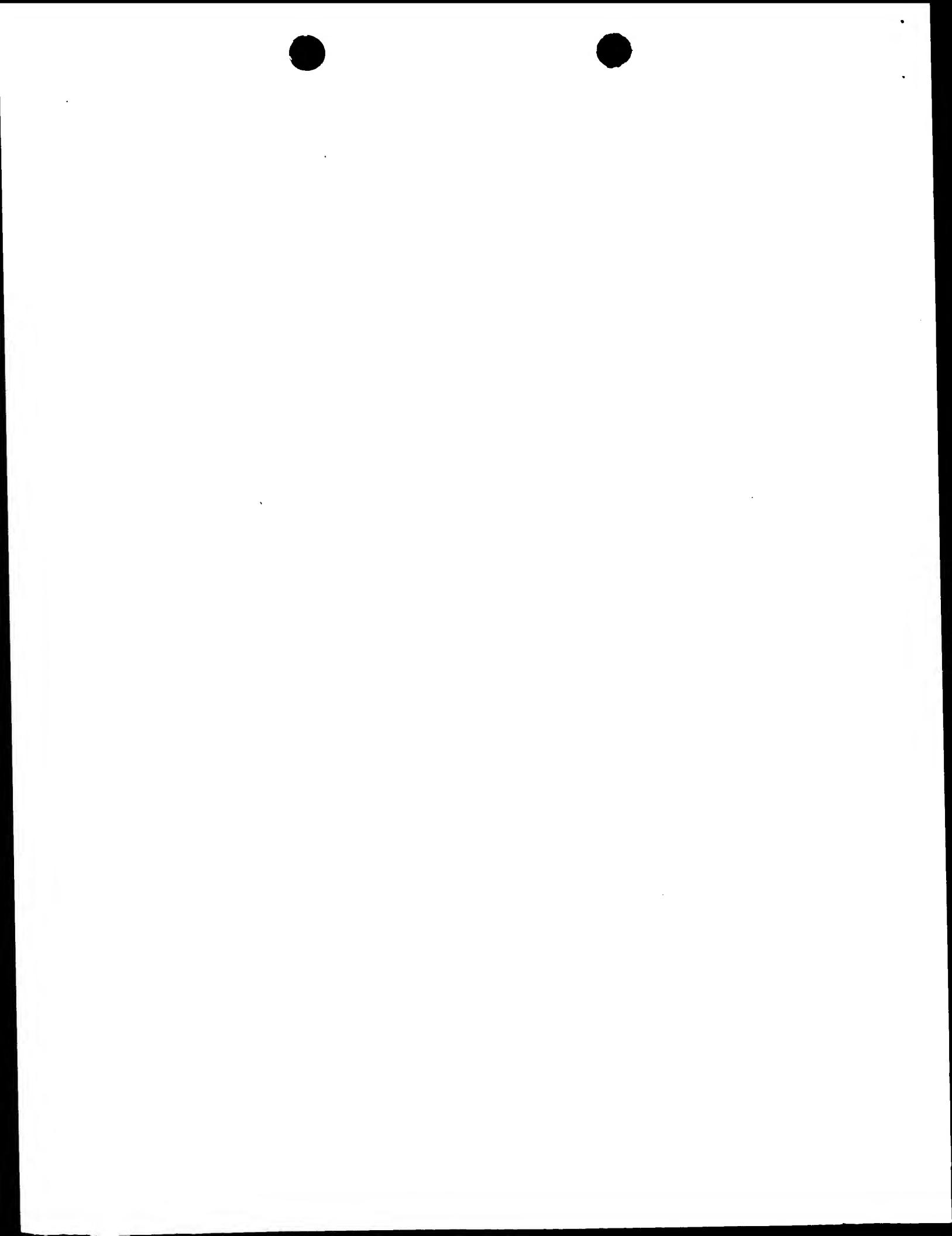
しかし、文献2 (JP, 7-173069, A (株式会社ツムラ) 11. 7月. 1995 (11. 07. 95) ファミリーなし) の文献全体、文献3 (YAMADA, Haruki et al, *In vivo* Antiinfluenza Virus Activity of Kampo Medicine Sho-Seiryu-To Through Mucosal Immune System, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1998, Vol. 20, No. 3, pp. 185-192) の文献全体には、アジュバントとして小青龍湯が記載されており、文献4 (MARUNO, Masao, Research for active principles of Pinelliae Tuber and new preparation of crude drug, Journal of Traditional Medicines, 1997, Vol. 14, pp. 81-88) のAbstract, Fig. 2には、小青龍湯の成分である半夏にヒドロキシ不飽和脂肪酸である9, 12, 13-トリヒドロキシ-10E-オクタデセン酸が記載されており、医薬の分野において、ある活性を有する組成物中で、特にその活性を有する一成分を同定することは通常行われることであるし、文献1のヒドロキシ不飽和脂肪酸がアジュバント作用を有するという記載に基づいて、文献4記載のアジュバント作用を有する小青龍湯の成分である半夏の構成成分のうちヒドロキシ不飽和脂肪酸である、9, 12, 13-トリヒドロキシ-10E-オクタデセン酸がアジュバント作用を有することを予測し、確認することは当業者が容易になし得ることであるし、文献5 (WO, 96/06627, A1 (THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND) 07. 3月. 1996 (07. 03. 96) & US, 6019982, A&EP, 777490, A1&JP, 10-505059, A) のCLAIMS、文献6 (JP, 5-9130, A (武田薬品工業株式会社) 19. 1月. 1993 (19. 01. 93) ファミリーなし) の【特許請求の範囲】、【0002】には、アジュバント及び広範な免疫原を含むワクチン製剤が記載されていることから、上記アジュバントとしてのヒドロキシ不飽和脂肪酸を、広範な免疫原を含むワクチン製剤に適用すること



補充欄（いずれかの欄の大きさが足りない場合に使用すること）

## 第 V 欄の続き

は当業者が容易に想到し得ることである。  
よつて、請求の範囲 1-5, 7, 8 は進歩性を有しない。



## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
〔P C T 18条、P C T規則43、44〕

出願人又は代理人 の書類記号 K4-004 P C T	今後の手続きについては、国際調査報告の送付通知様式(P C T / I S A / 2 2 0)及び下記5を参照すること。	
国際出願番号 P C T / J P 0 0 / 0 1 2 8 9	国際出願日 (日.月.年) 03.03.00	優先日 (日.月.年) 03.03.99
出願人(氏名又は名称) 株式会社 北里研究所		

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条(P C T 18条)の規定に従い出願人に送付する。  
この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。  
 この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでおり、次の配列表に基づき国際調査を行った。  
 この国際出願に含まれる書面による配列表  
 この国際出願と共に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に、この国際調査機関に提出された書面による配列表  
 出願後に、この国際調査機関に提出されたフレキシブルディスクによる配列表  
 出願後に提出した書面による配列表が出願時における国際出願の開示の範囲を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。  
 書面による配列表に記載した配列とフレキシブルディスクによる配列表に記録した配列が同一である旨の陳述書の提出があった。

2.  請求の範囲の一部の調査ができない(第I欄参照)。

3.  発明の単一性が欠如している(第II欄参照)。

4. 発明の名称は  出願人が提出したものと承認する。

次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は  出願人が提出したものと承認する。

第III欄に示されているように、法施行規則第47条(P C T規則38.2(b))の規定により国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1ヶ月以内にこの国際調査機関に意見を提出することができる。

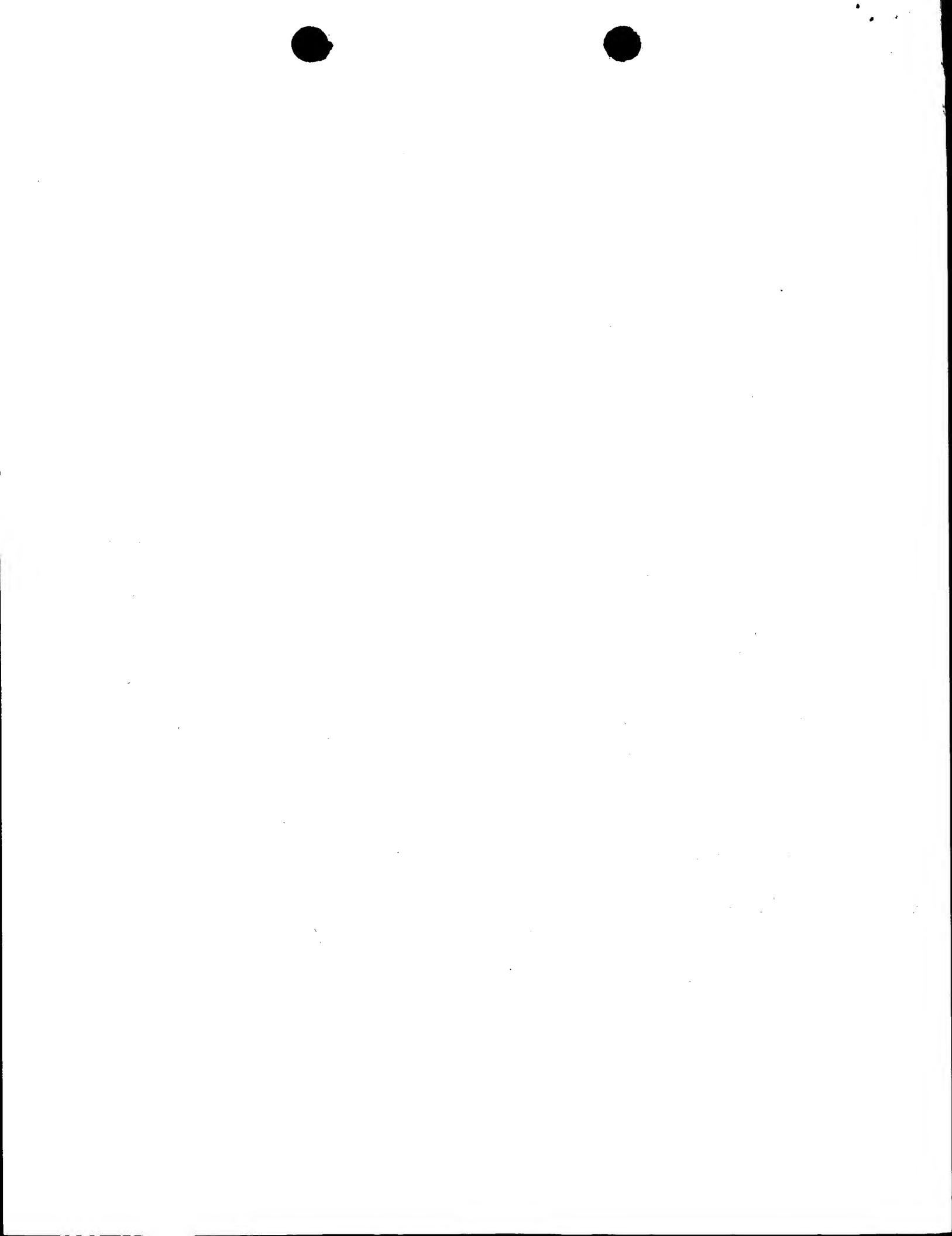
## 6. 要約書とともに公表される図は、

第        図とする。  出願人が示したとおりである。

なし

出願人は図を示さなかった。

本図は発明の特徴を一層よく表している。



## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT第17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 9, 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、  
請求の範囲9, 10は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT第17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。
2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をできる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

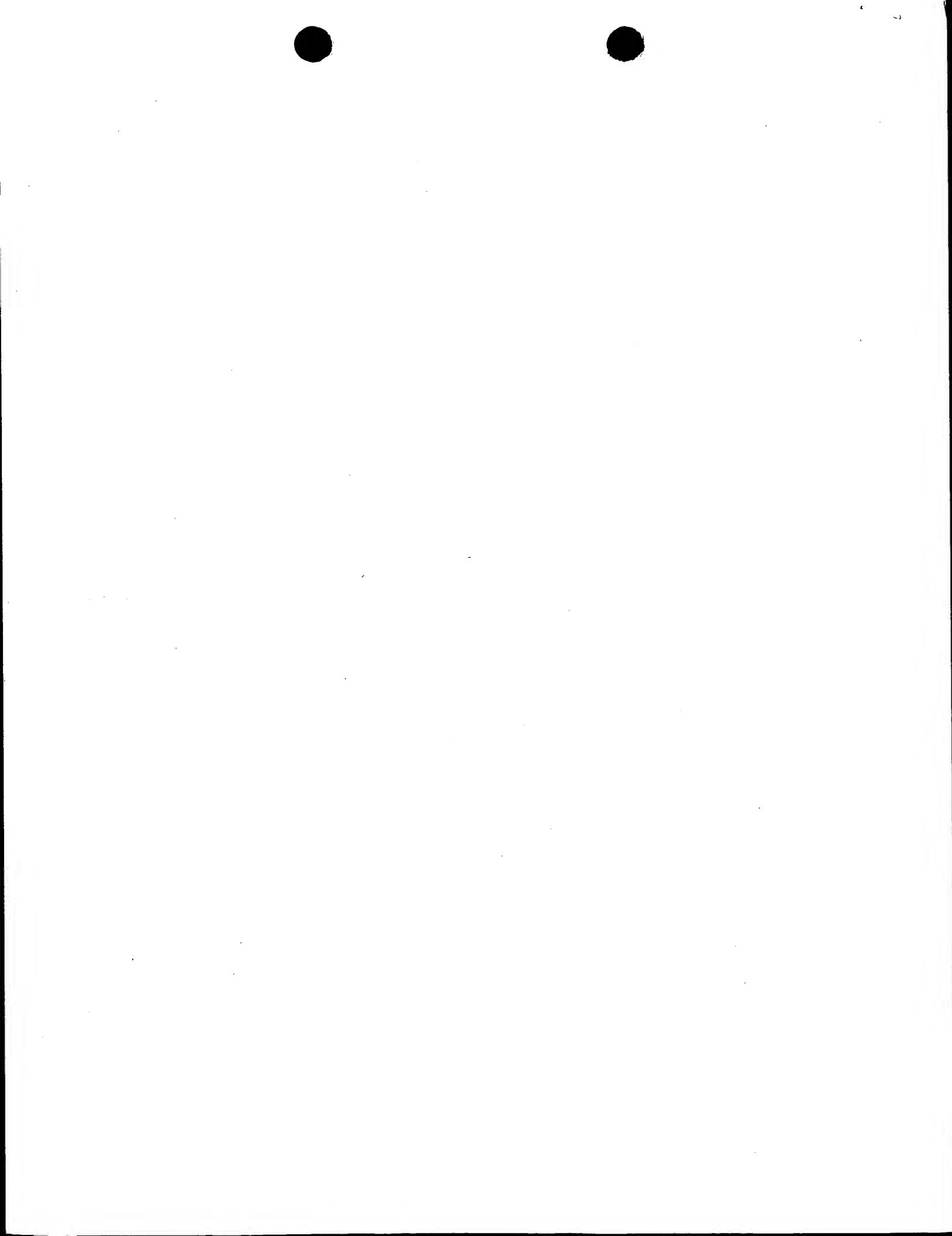
## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K39/39, 39/145, 39/15, 39-165, 39/21, 39/10, 39/05, 39/106, 39/108, 39/118, 39/00, 39/012, 39-015,  
A61P31/14, 31/16, 31/18, 31/20, 31/04, 33/06, 33/02, 33/12, 33/10, 33/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K39/39, 39/145, 39/15, 39-165, 39/21, 39/10, 39/05, 39/106, 39/108, 39/118, 39/00, 39/012, 39-015,  
A61P31/14, 31/16, 31/18, 31/20, 31/04, 33/06, 33/02, 33/12, 33/10, 33/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), REGISTRY (STN),  
BIOSIS (STN), WPIL (QUESTEL)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X	WO, 96/00609, A1 (SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES-SEPPIC) 24. 10月. 1996 (24. 10. 96) CLAIM13, 第7ページ下から4 行-第9ページ第25行、特に、第9ページ第2行 & FR, 2733151, A1&EP, 825875, A1 & JP, 11-503743, A	1, 5-8
Y	JP, 7-173069, A (株式会社ツムラ) 11. 7月. 1995 (11. 07. 95) 文献全体 ファミリーなし	2-4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す  
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日  
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行  
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する  
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

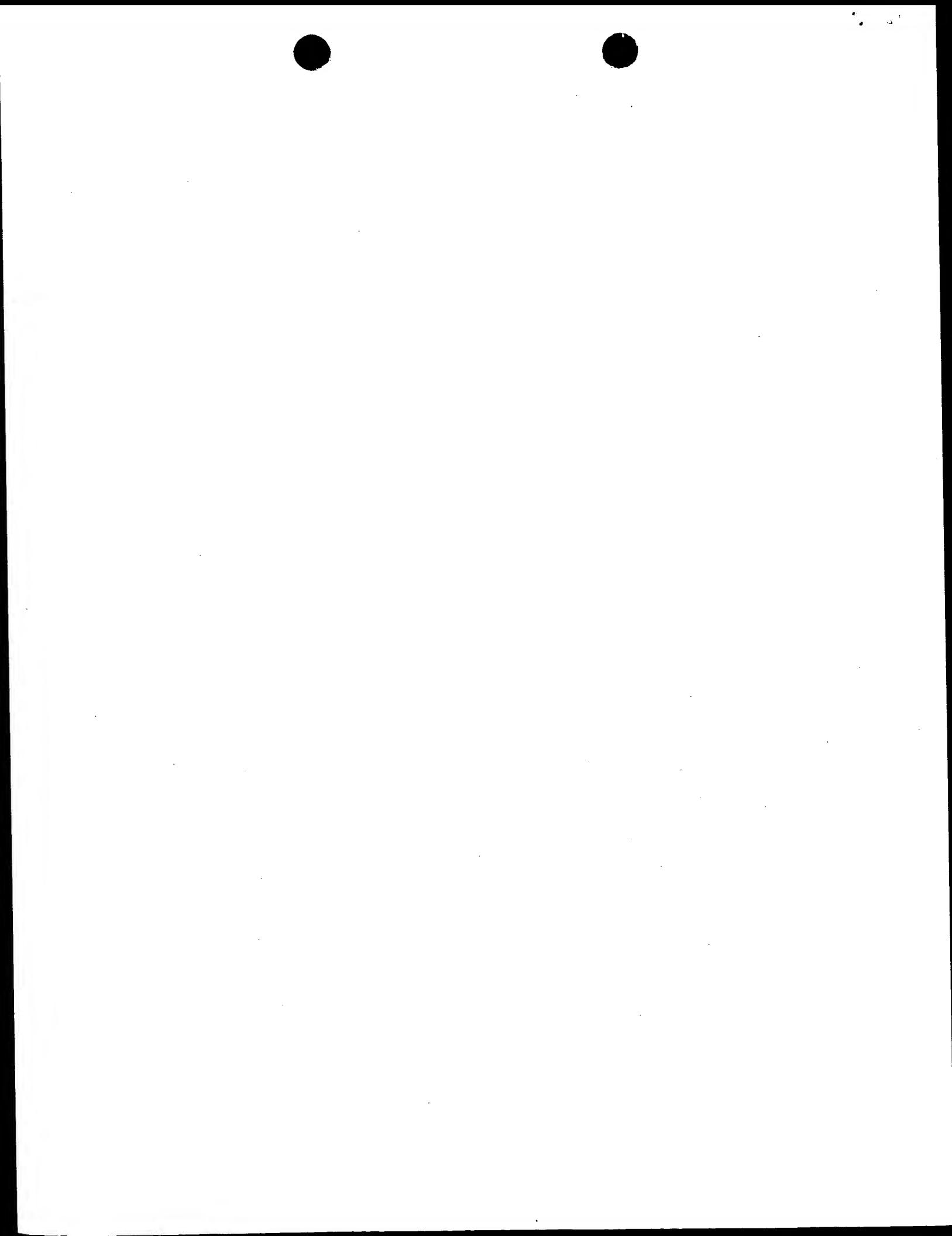
「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって  
て出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理  
論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明  
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

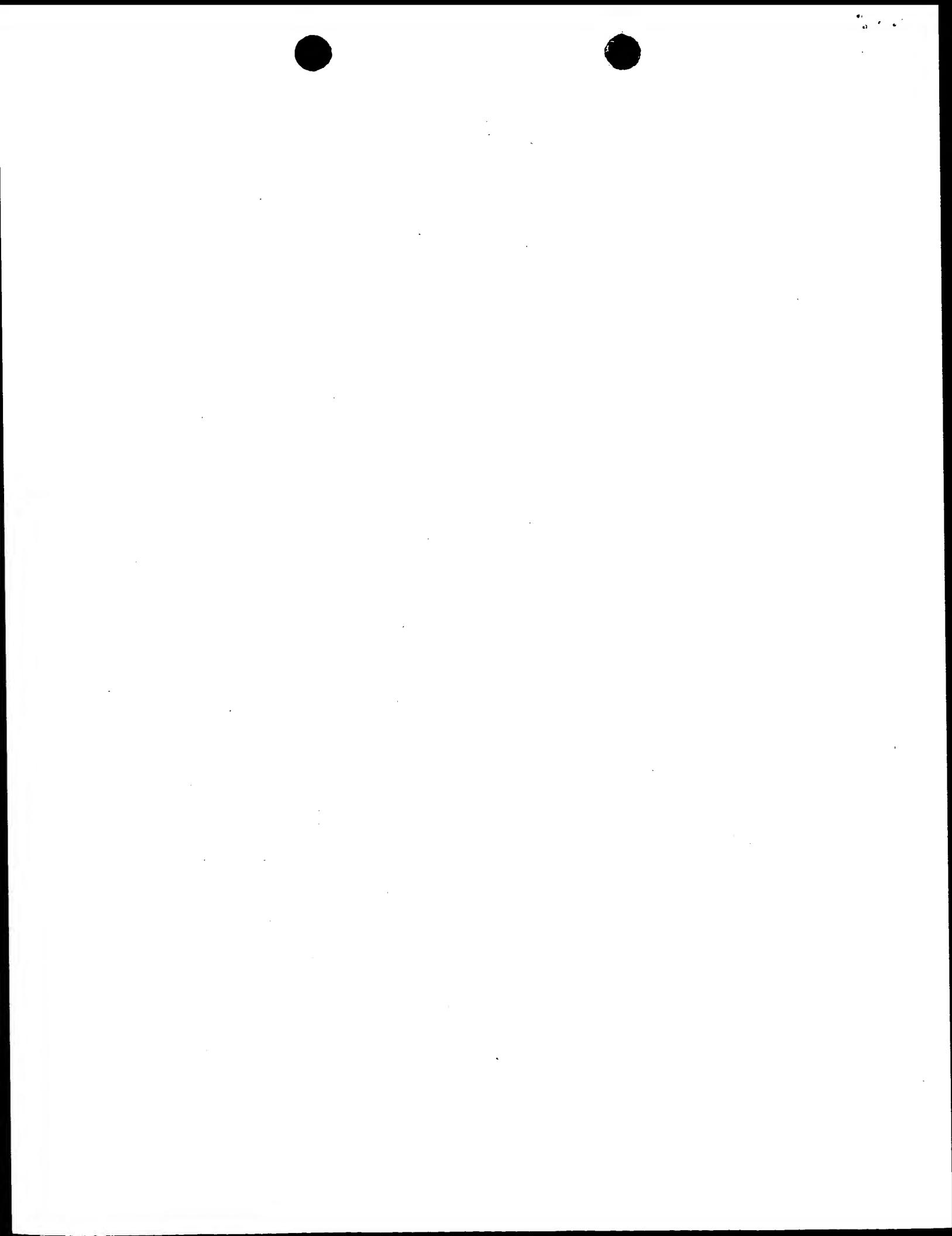
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以  
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに  
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日 09.05.00	国際調査報告の発送日 23.05.00
国際調査機関の名称及びあて先 日本国特許庁 (ISA/JP) 郵便番号 100-8915 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号	特許庁審査官 (権限のある職員) 渢原下告一 (印) 電話番号 03-3581-1101 内線 3452 4C 9284



C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	YAMADA, Haruki et al, <i>In vivo</i> Antiinfluenza Virus Activity of Kampo Medicine Sho-Seiryu-To Through Mucosal Immune System, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1998, Vol. 20, No. 3, pp. 185-192, 文献全体	2-4
Y	MARUNO, Masao, Research for active principles of Pinelliae Tuber and new preparation of crude drug, Journal of Traditional Medicines, 1997, Vol. 14, pp. 81-88, 特にAbstract, Fig. 2	2-4
Y	WO, 96/06627, A1 (THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND) 07. 3月. 1996 (07. 03. 96) CLAIMS & US, 6019982, A&EP, 777490, A1 & JP, 10-505059, A	8
Y	JP, 5-9130, A (武田薬品工業株式会社) 19. 1月. 1993 (19. 01. 93) 【特許請求の範囲】、【0002】	8



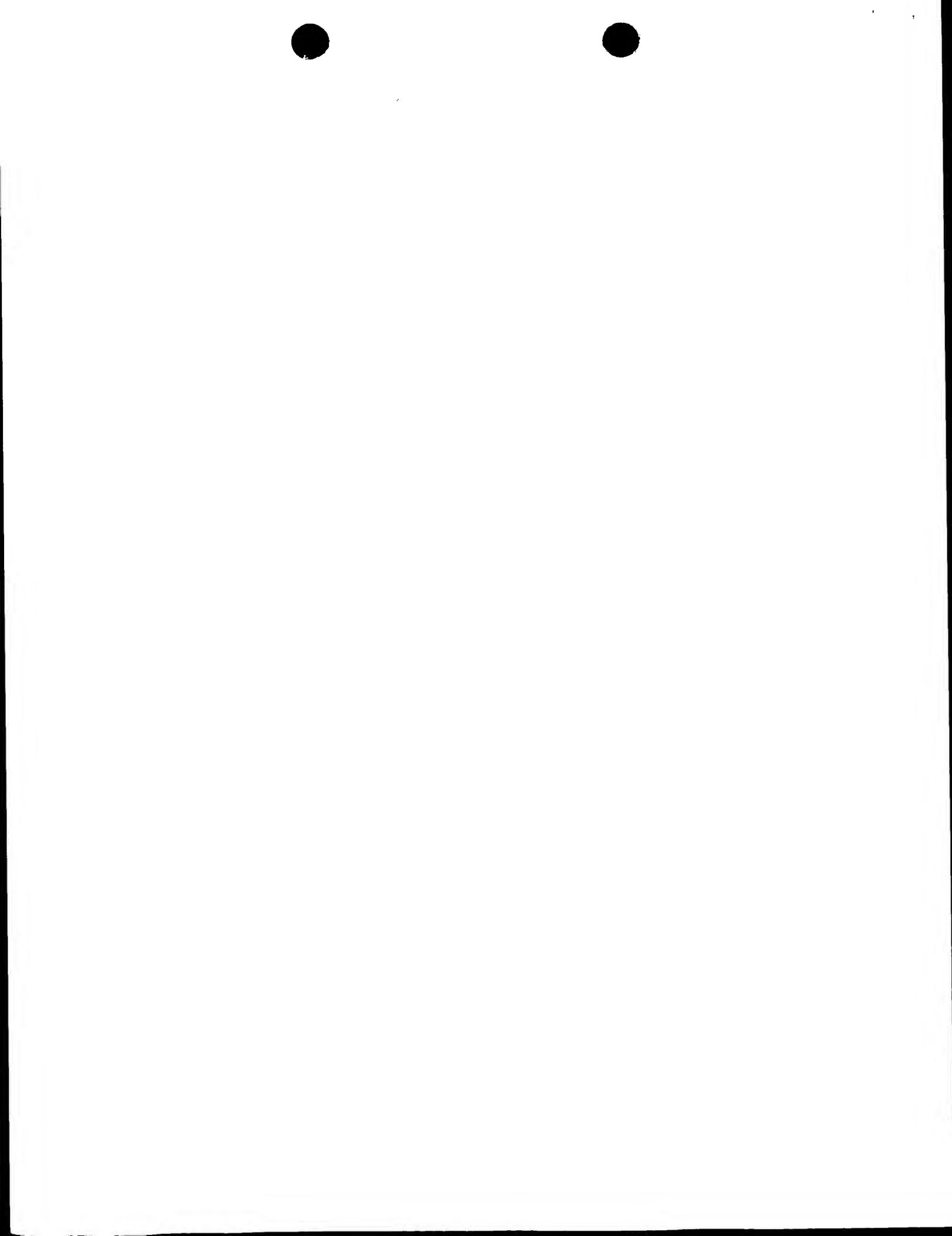
PCT

WORLD INTELLECTUAL PROPERTY ORGANIZATION  
International Bureau



INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

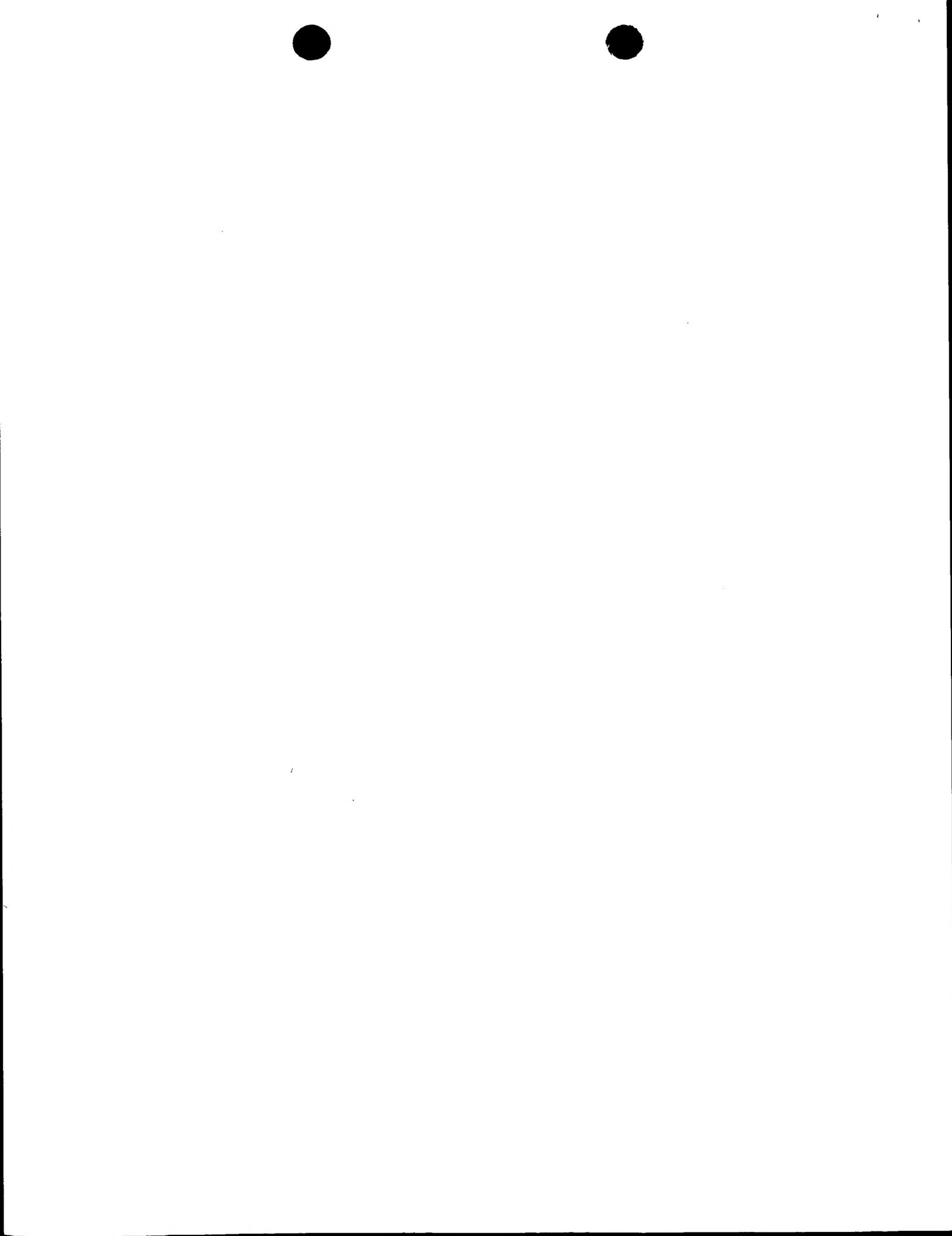
(51) International Patent Classification <sup>6</sup> : <b>B01F 15/02</b>		A1	(11) International Publication Number: <b>WO 96/00609</b> (43) International Publication Date: 11 January 1996 (11.01.96)
(21) International Application Number: <b>PCT/US95/07656</b> (22) International Filing Date: 16 June 1995 (16.06.95)  (30) Priority Data: 9413114.1 30 June 1994 (30.06.94) GB		(81) Designated States: JP, MX, US.  <b>Published</b> <i>With international search report. Before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of the receipt of amendments.</i>	
(71) Applicant (for all designated States except US): THE PROCTER & GAMBLE COMPANY [US/US]; One Procter & Gamble Plaza, Cincinnati, OH 45202 (US).  (72) Inventor; and (75) Inventor/Applicant (for US only): VANWELSENNAERS, Nocl [BE/BE]; Reigerstraat 12, B-1840 Londerzeel (BE).  (74) Agents: REED, T., David et al.; The Procter & Gamble Company, 5299 Spring Grove Avenue, Cincinnati, OH 45217 (US).			
(54) Title: <b>MIXING APPARATUS FOR LIQUIDS</b>			
(57) Abstract			
<p>An apparatus for mixing two or more liquids comprising a mixing chamber (1), two or more liquid inlets (20, 30), and a liquid outlet (40); wherein the mixing chamber (1) further comprises a gas inlet (50), and a means for regulating the pressure of the gas at the gas inlet. The lower section (3) of the mixing chamber contains liquid or liquids, and the upper section (4) of the mixing chamber contains gas. Preferably the liquid inlets (20, 30) are located in the lower section (3) of the mixing chamber, and the gas inlet (50) is located in the upper section (4) of the mixing chamber.</p>			



**FOR THE PURPOSES OF INFORMATION ONLY**

Codes used to identify States party to the PCT on the front pages of pamphlets publishing international applications under the PCT.

AT	Austria	GB	United Kingdom	MR	Mauritania
AU	Australia	GE	Georgia	MW	Malawi
BB	Barbados	GN	Guinea	NE	Niger
BE	Belgium	GR	Greece	NL	Netherlands
BF	Burkina Faso	HU	Hungary	NO	Norway
BG	Bulgaria	IE	Ireland	NZ	New Zealand
BJ	Benin	IT	Italy	PL	Poland
BR	Brazil	JP	Japan	PT	Portugal
BY	Belarus	KE	Kenya	RO	Romania
CA	Canada	KG	Kyrgyzstan	RU	Russian Federation
CF	Central African Republic	KP	Democratic People's Republic of Korea	SD	Sudan
CG	Congo	KR	Republic of Korea	SE	Sweden
CH	Switzerland	KZ	Kazakhstan	SI	Slovenia
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovakia
CM	Cameroon	LK	Sri Lanka	SN	Senegal
CN	China	LU	Luxembourg	TD	Chad
CS	Czechoslovakia	LV	Latvia	TG	Togo
CZ	Czech Republic	MC	Monaco	TJ	Tajikistan
DE	Germany	MD	Republic of Moldova	TT	Trinidad and Tobago
DK	Denmark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Spain	ML	Mali	US	United States of America
FI	Finland	MN	Mongolia	UZ	Uzbekistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				



## MIXING APPARATUS FOR LIQUIDS

The requirement to mix liquids in continuous chemical processing is widespread in all branches of chemical engineering, and consequently many mixing devices are commercially available to do this. Many of these mixing devices are specifically adapted to suit certain process needs.

Mixers used in continuous processing may be characterised either as dynamic mixers or as static mixers. In the case of dynamic mixers an external source of energy provides the work needed to thoroughly and intimately mix two or more liquids. Typically the work is done on the liquids by means of a rotor, or a series of rotors which are driven from an external source. In the case of static mixers it is the kinetic energy of the liquids themselves that provides the work needed to mix them.



A particular kind of static mixer, which is known in the prior art for mixing gases comprises a chamber with a mechanical device for damping out pressure fluctuations. One such device is described in :

EP117699, published on 5th September, 1984, which discloses a chamber for mixing gases (in particular anaesthetic gases for medical purposes). The chamber has multiple inlets and a single outlet.

It is an aim of the present invention to provide an apparatus which acts as a static mixer, and which is specifically adapted for use to mix liquids.

It is a further aim of the present invention to provide an apparatus which acts simultaneously as a mixer and a pressure pulsation damper for liquids.

These aims are achieved by means of an apparatus comprising a mixing vessel with two or more inlets, and a single outlet. Each one of the liquids to be mixed is introduced into the mixing vessel through an inlet. The inlets may be oriented in a manner suitable to maximise the mixing effect.



The mixing vessel also acts as a pressure pulsation damper due to the presence of a gas pocket above the liquid surface.

#### Summary of the Invention

An apparatus for mixing two or more liquids comprising a mixing chamber, two or more liquid inlets, and a liquid outlet; wherein the mixing chamber further comprises a gas inlet, and a means for regulating the pressure of the gas at the gas inlet.

The lower section of the mixing chamber contains liquid or liquids, and the upper section of the mixing chamber contains gas. Preferably the liquid inlets are located in the lower section of the mixing chamber, and the gas inlet is located in the upper section of the mixing chamber.

In a preferred embodiment of the invention the mixing chamber is in the form of a cylinder, the axis of the cylinder being vertically oriented, said cylinder having a top wall and a bottom wall. The mouth of said liquid outlet is positioned closer to the top wall than the bottom wall within the cylindrical chamber.



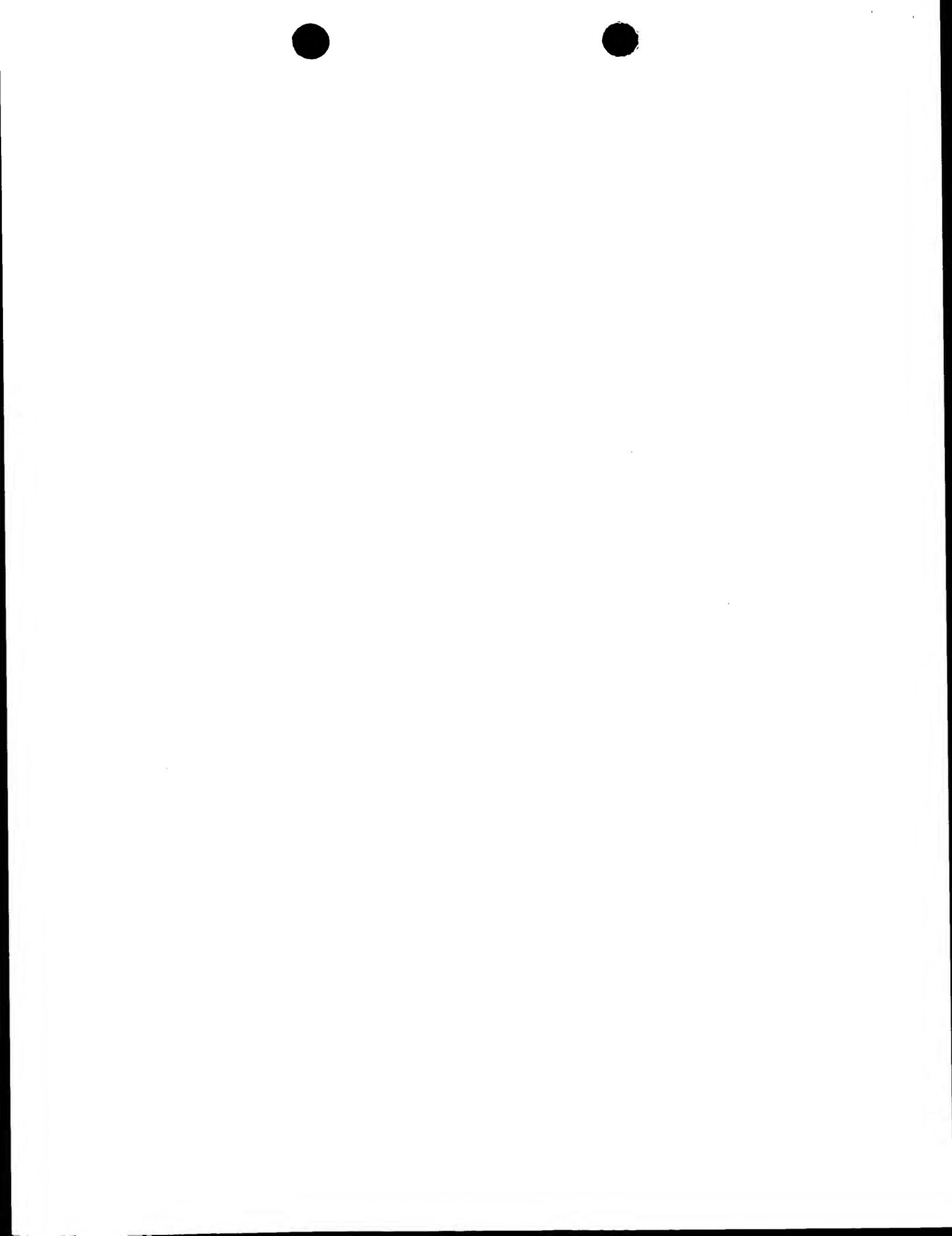
In a more preferred embodiment two liquid inlets are oriented such that the mouths of said inlets are substantially opposed and aligned on substantially the same axis. The distance between the opposing mouths of the liquid inlets being not more than 5 times the diameter of the internal diameter largest liquid inlet.

#### Detailed Description of the Invention

The mixer of the present invention has a number of advantages. It is a static mixer (i.e. a mixer with no moving parts) which nevertheless has the effect of a dynamic mixer. It is therefore inexpensive to manufacture, operate and maintain. It also has a very high mixing efficiency and is equally effective for mixing very small amounts of liquid at low throughput rates and very high amounts of liquid at high throughput rates.

Unlike other static mixers, the mixer of the present invention presents little or no obstacle to the liquid flow and there is therefore no pressure drop between the inlet and outlet of the mixer (i.e. no "backpressure")

The mixer of the present invention can be used to mix liquids in the preparation of foodstuffs, detergents etc.



Furthermore the mixer can be used to intimately mix two or more components which are chemically reactive. The chemical reaction is then started (and may even be completed) in the chamber of the mixer itself.

The mixing chamber may be jacketed, either for heating or for cooling. Heating may be desirable if it is required to promote a chemical reaction in the mixer. Cooling may be desirable if an exothermic reaction is producing heat in the mixer.

The effectiveness of mixing will be influenced by many parameters including the inlet pressures, and the velocity of the liquids when they are introduced into the mixing chamber, as well as the dimensions of the chamber and the number and orientation of the liquid inlets .

The invention will now be described by way of example and with reference to the accompanying drawings in which :

Figure 1 is a sectional view of a mixer of the present invention viewed from the side.

Figure 2 shows a plan view of a preferred embodiment of the present invention, with the top of the chamber removed.

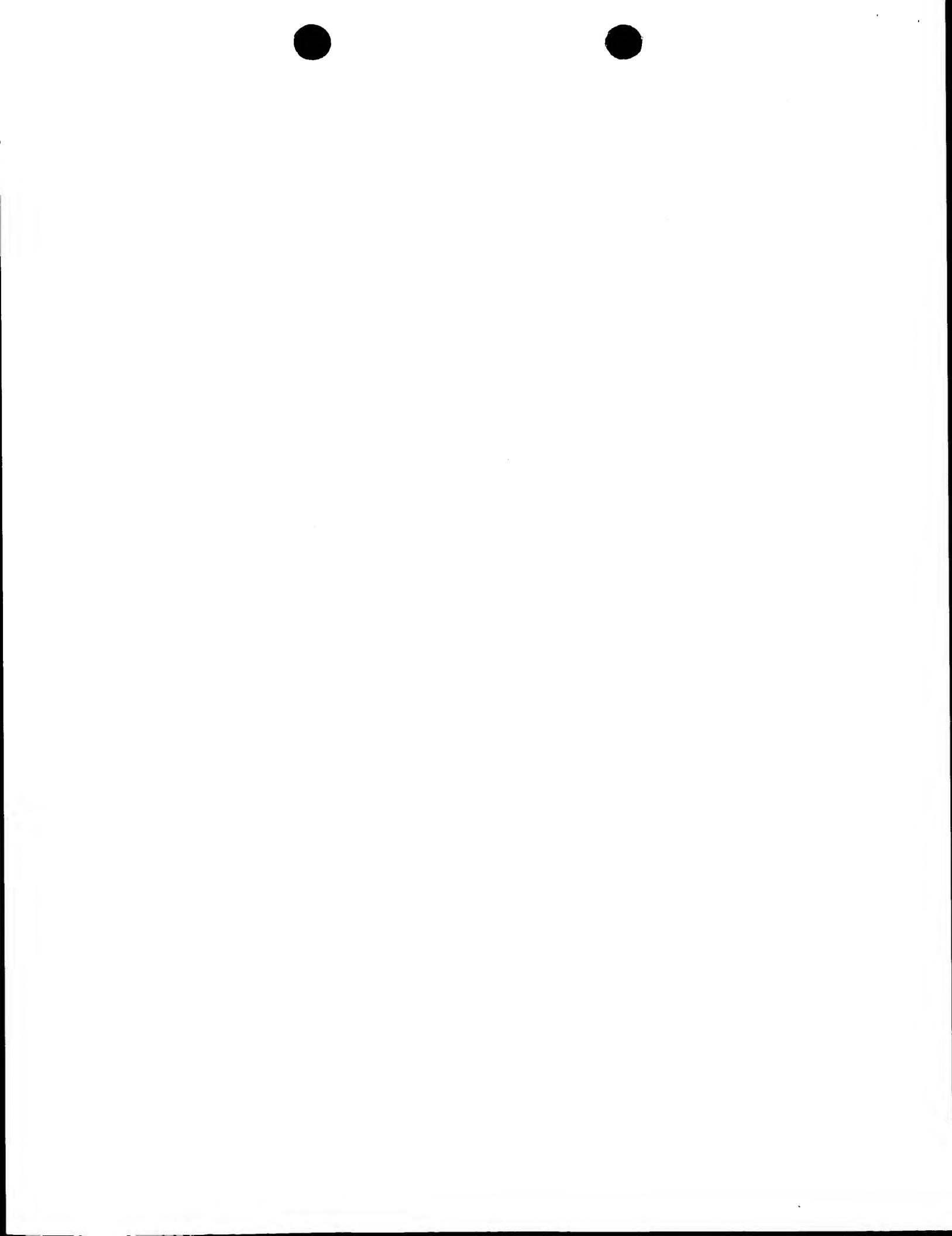


Figure 3 is a sectional view A-A, showing detail of a modified arrangement of liquid inlets of the preferred embodiment of figure 2.

The mixer 1 of figure 1 comprises a closed cylindrical chamber 2 having a height of 400mm and a diameter of 30mm. There are two liquid inlets to the chamber 20, 30, both of which are pipes having an internal diameter of 12mm, and both of which discharge into the chamber at a height of 50mm above the base of the chamber. A liquid outlet 40 from the chamber is also provided, also having an internal diameter of 12mm. The mouth 41 of the liquid outlet is positioned 300mm above the base of the chamber.

The liquid outlet of the chamber effectively divides the chamber into a lower section 3 which is liquid filled, and an upper section 4 which is gas filled. The boundary between the upper and lower sections of the chamber is defined by the liquid surface, "S". The liquid surface is typically in the form of a vortex, the apex of the vortex being located at the mouth 41 of the liquid outlet 40.

The upper section 4 of the chamber is filled with gas under pressure. A gas inlet 50 and a pressure gauge 60 are provided in the upper section of the chamber wall. Valves 22, 32 and 42 are provided on each of the liquid inlets 20, 30, and the liquid outlet 40 in order to be able to regulate the flow of liquids into and out of the mixer. A



valve 52 is provided on the gas inlet 50. This valve 52 will normally be closed in steady state operation in order to isolate the gas in the upper section 4 of the chamber from the gas supply. A pressure regulator (not shown) is also included in order to control (either automatically or manually) the gas pressure in the upper section of the mixing chamber.

Figures 2 and 3 show a similar mixer to figure 1, in which the orientation of the two liquid inlets 20, 30 has been modified to improve the mixing effect. The mouths 121, 131 of the liquid inlets ensure that the flow of liquid from one of the inlets is directed towards the mouth of the other inlet. This orientation generates high relative velocity of one incoming liquid to the other thereby maximising the kinetic mixing effect. In figure 2, the mouths 121, 131 of the liquid inlets are positioned 30 mm apart.

The dimensions of the embodiment described above are those of one particular embodiment of the invention. However, the man skilled in the art will appreciate that the detailed design of any given mixer will require appropriate choice of overall size and relative dimensions of the mixing apparatus depending on the process parameters, such as throughput, number of liquids to be mixed, fluid flow properties of the liquids to be mixed etc.



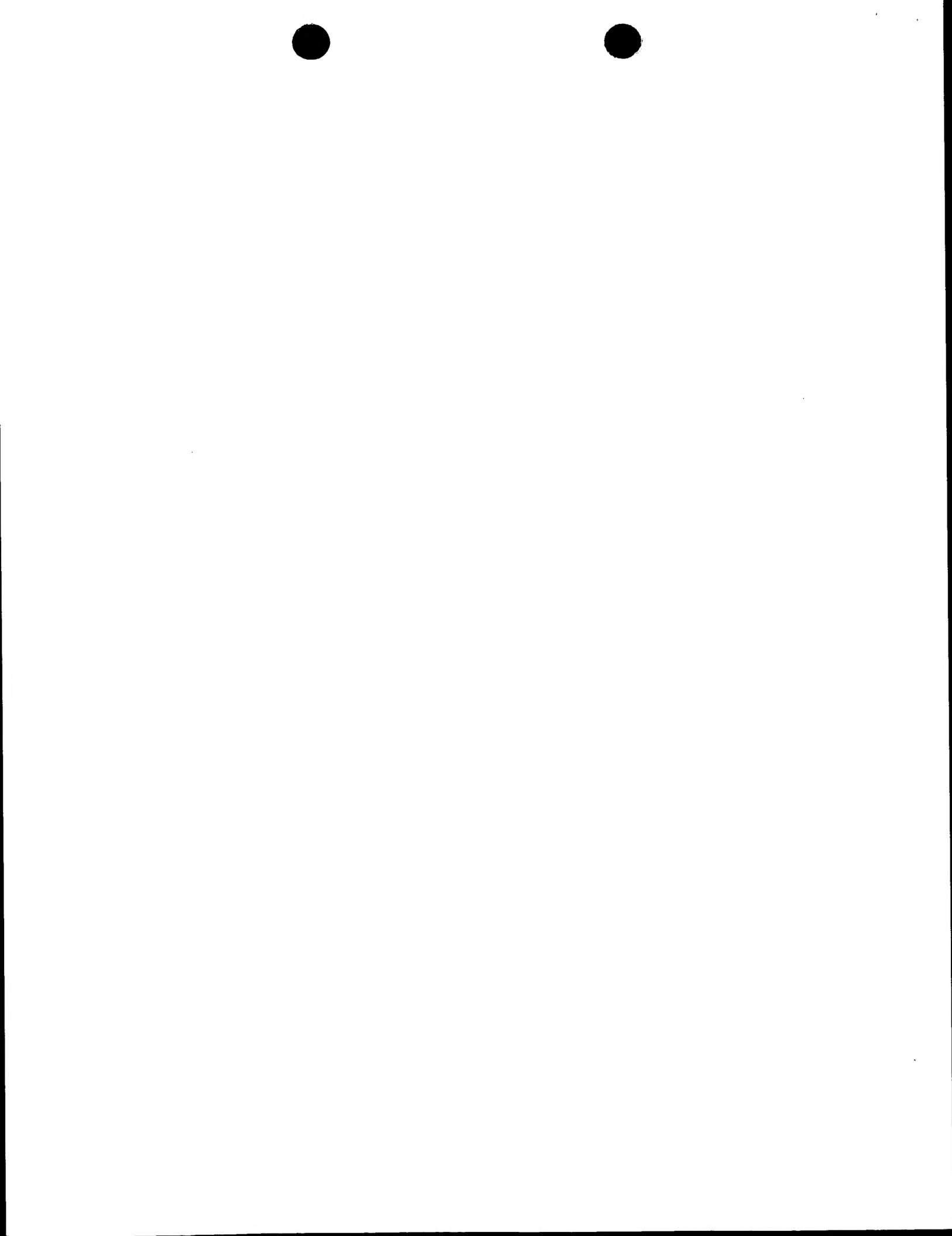
Furthermore the mixing apparatus may be made from any suitable material of construction. The choice will be determined by the liquids to be used (corrosivity considerations etc.), the operating temperature, required pressure etc. Some suitable materials of construction are carbon steel, stainless steel, aluminium, glass, perspex, and polymeric materials such as polyester etc.

Any gas may be used in the upper section of the chamber. Nitrogen and air are particularly suitable gasses.



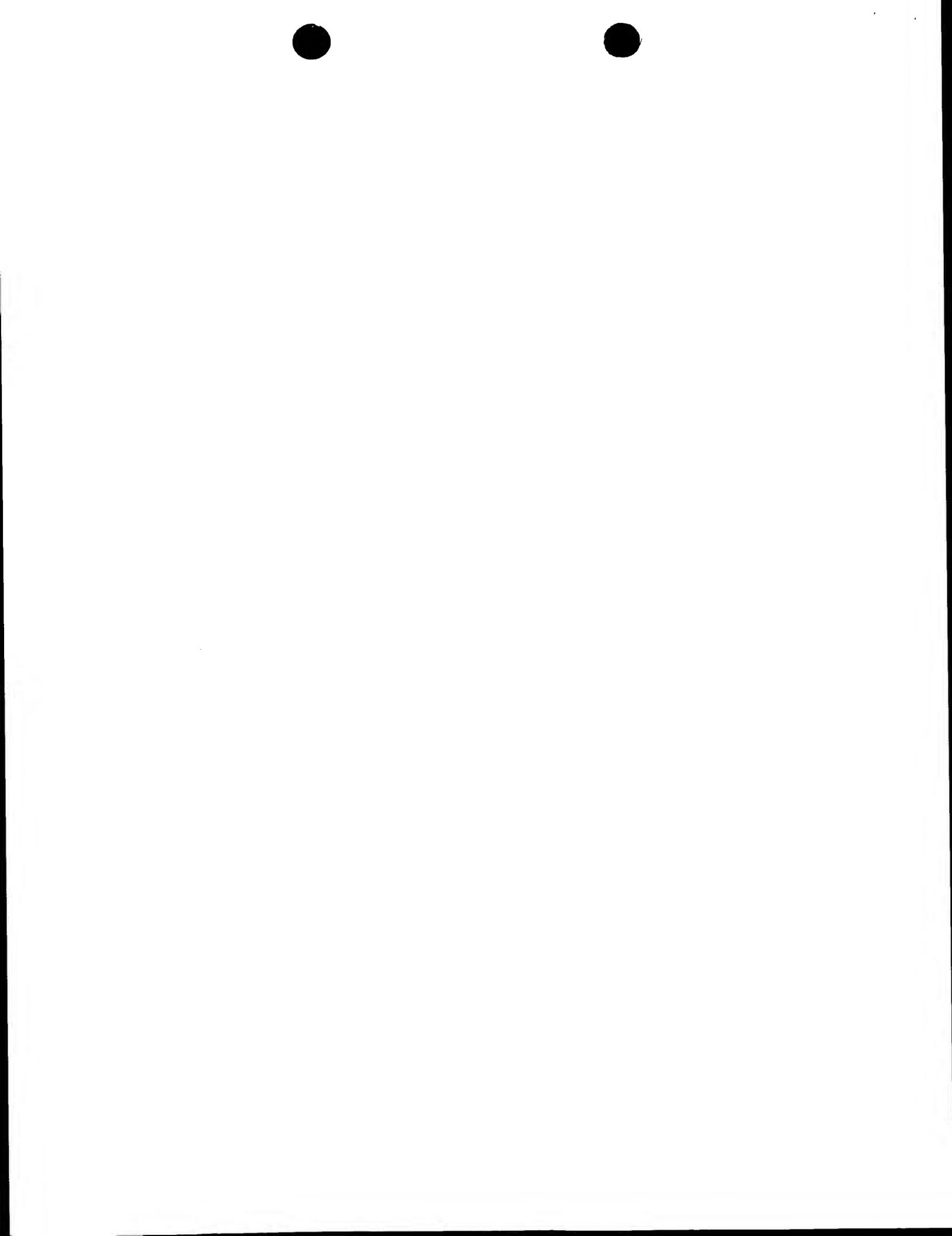
## CLAIMS

1. An apparatus for mixing two or more liquids comprising a mixing chamber (1), two or more liquid inlets (20, 30), a liquid outlet (40) and characterised in that the mixing chamber (1) further comprises a gas inlet (50), and a means for regulating the pressure of the gas at the gas inlet.
2. An apparatus according to claim 1, wherein a lower section (3) of the mixing chamber contains a liquid or a mixture of liquids, and an upper section (4) of the mixing chamber contains gas, and wherein said liquid inlets (20, 30) are located in the lower section (3) of the mixing chamber, and said gas inlet (50) is located in the upper section (4) of the mixing chamber.
3. An apparatus according to claim 2, wherein the mixing chamber is generally in the form of a cylinder, the axis of the cylinder being vertically oriented, said cylinder having a top wall (5) and a bottom wall (6).
4. An apparatus according to claim 3, wherein the liquid outlet (40) has a mouth (41), and wherein said mouth of said liquid outlet (40) is positioned closer to the top wall (5) than the bottom wall (6) within the cylindrical chamber (1).



5. An apparatus according to claim 2, wherein two liquid inlets (20, 30) are oriented such that the mouths of said inlets (121, 131) are substantially opposed and aligned on substantially the same axis.

6. An apparatus according to claim 5, wherein the distance between the opposing mouths of the liquid inlets (121, 131) is not more than 5 times the internal diameter of the largest liquid inlet.



1/2

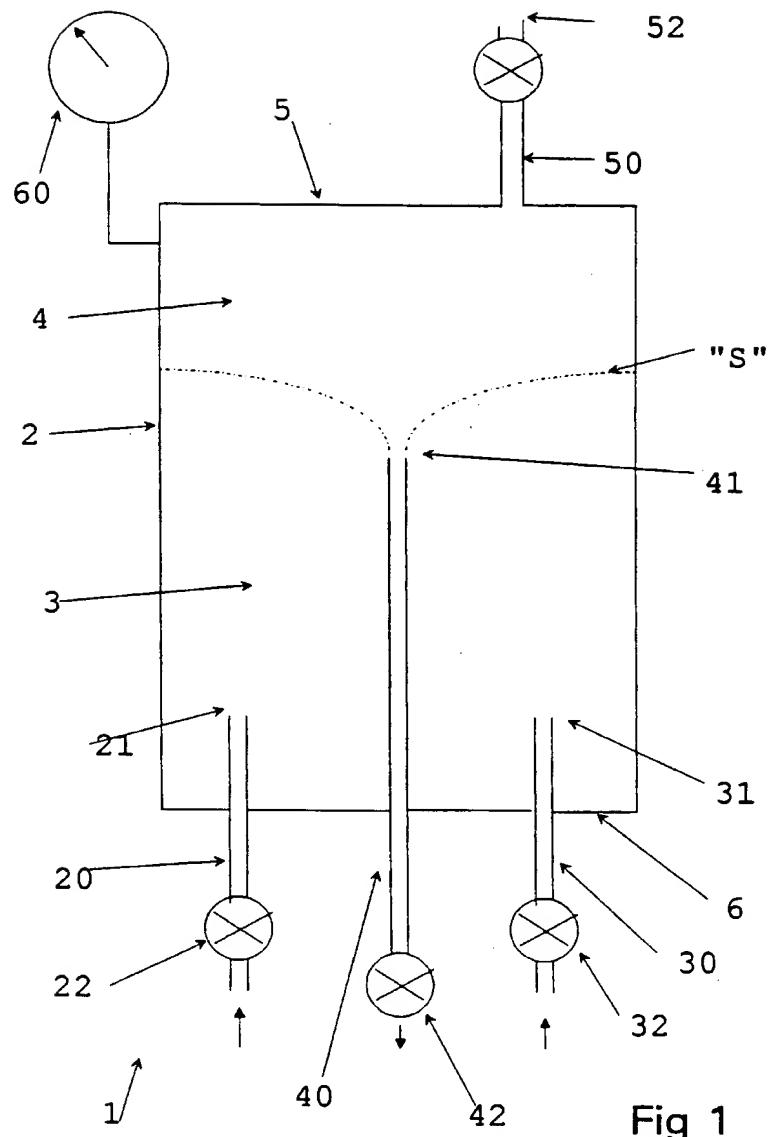
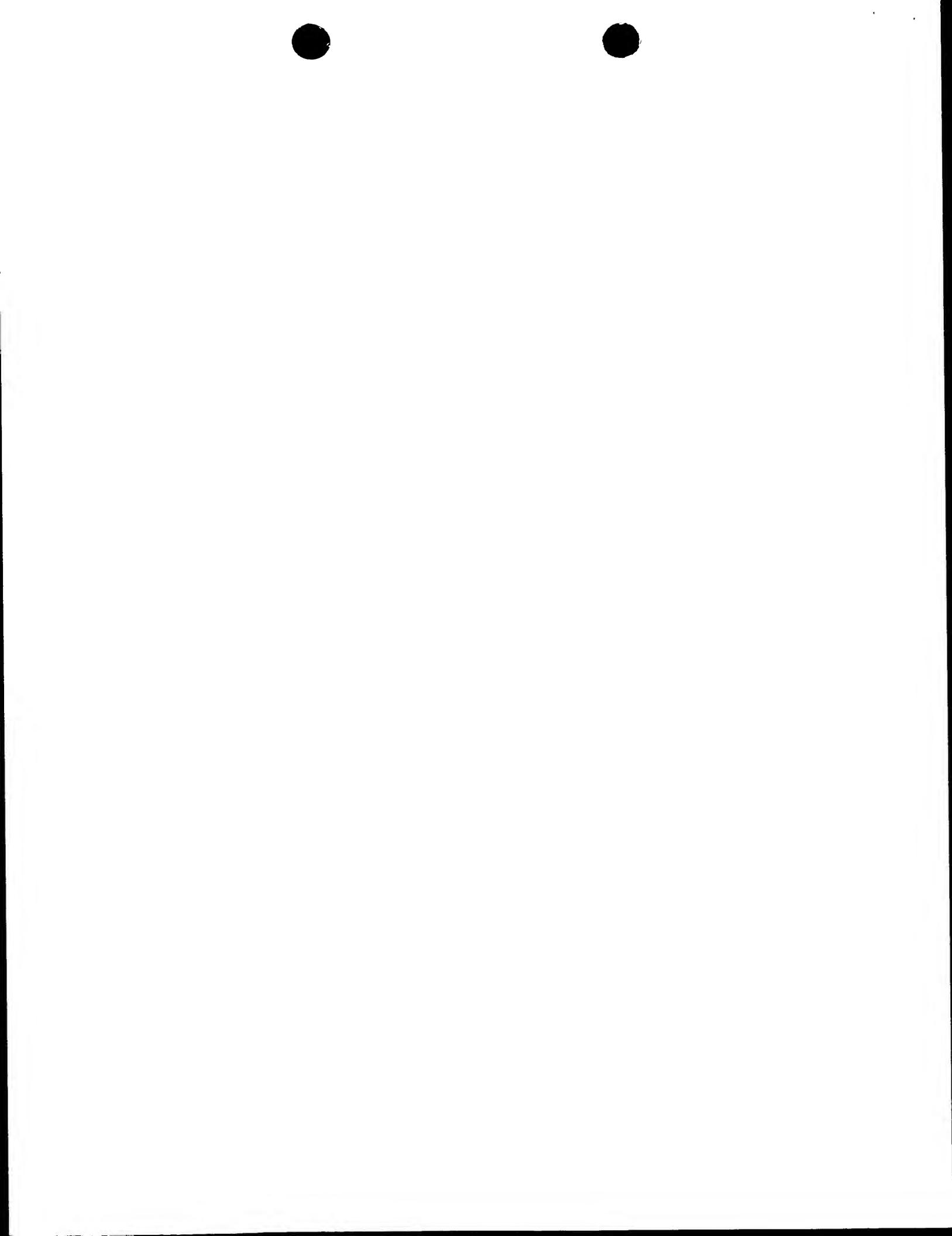


Fig 1



2/2

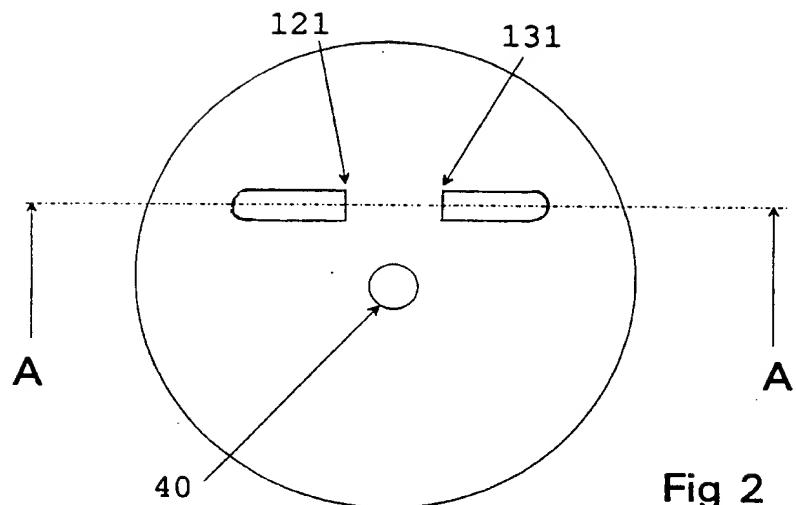


Fig 2

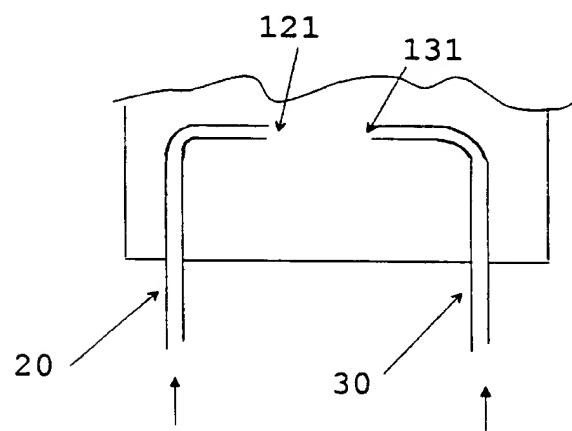
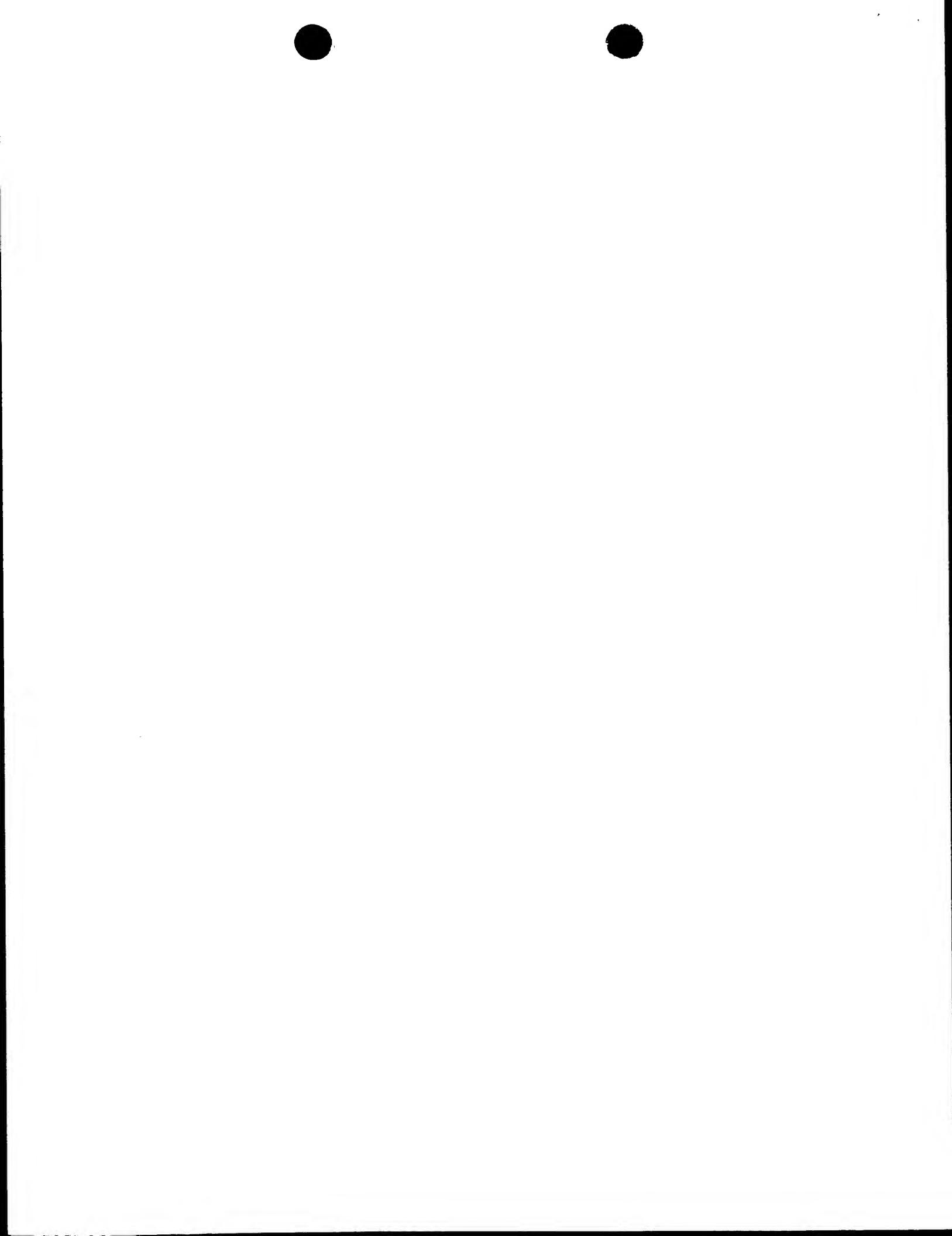


Fig 3



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/07656

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(6) :B01F 15/02

US CL :366/150.1, 162.4, 173.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : Please See Extra Sheet.

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

NONE

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

NONE

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A 4,669,888 (YAMAGUCHI) 02, JUNE 1987.	1
A	US,A 3,948,490 (TROOPE) 06, APRIL 1976.	1-6
A	US,A 5,124,088 (STUMPHAUZER) 23, JUNE 1992.	1-6
A	US,A 2,976,024 (MARTINEK) 21, MARCH 1961.	1-6

 Further documents are listed in the continuation of Box C.  See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T"	later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document published on or after the international filing date	"Y"	document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&"	document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means		
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		

Date of the actual completion of the international search 15 SEPTEMBER 1995	Date of mailing of the international search report <b>07 DEC 1995</b>
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230	Authorized officer <i>J. Hurley for</i> ROBERT W. JENKINS Telephone No. (703) 308-1274

Form PCT/ISA/210 (second sheet)(July 1992)\*



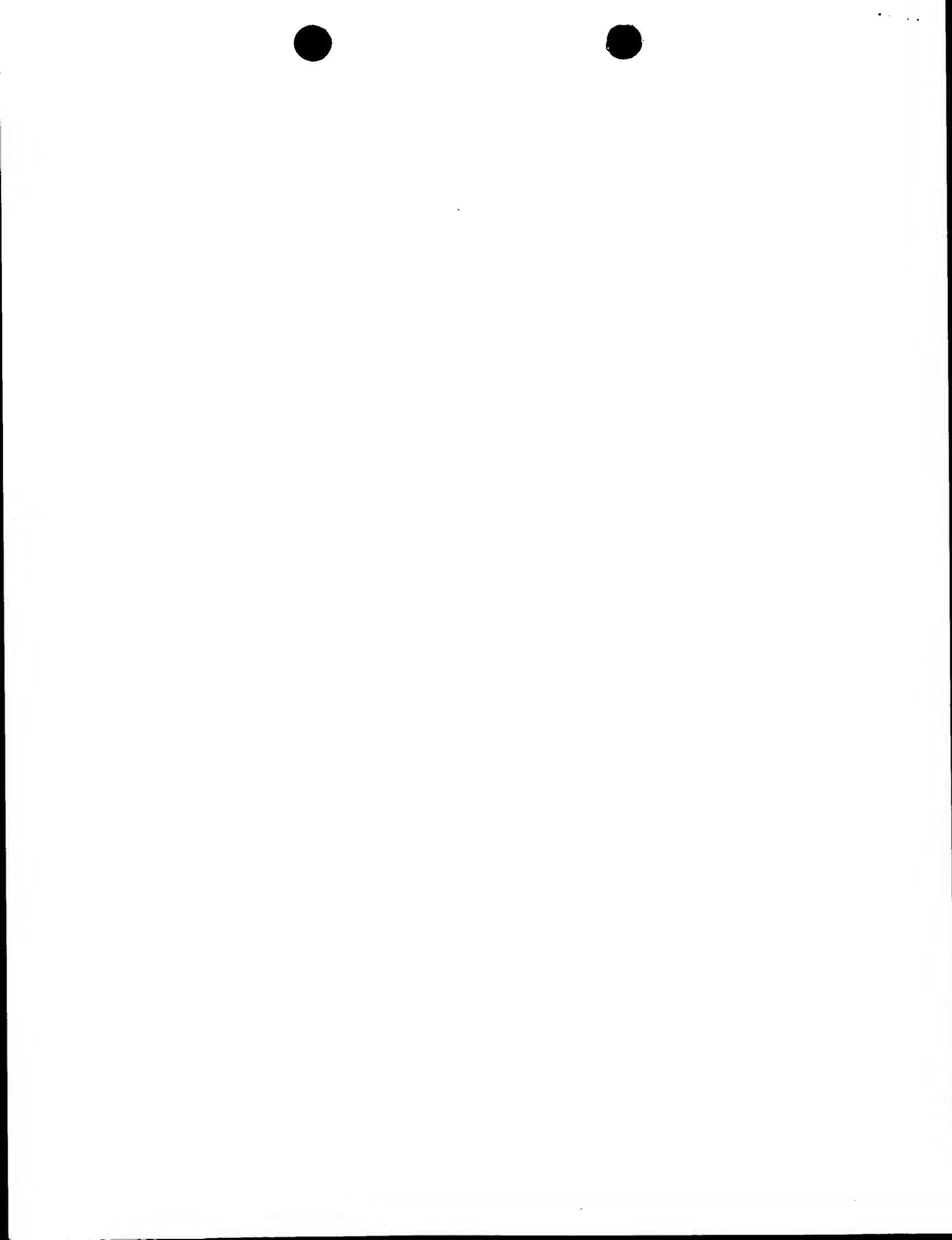
INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US95/07656

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched  
Classification System: U.S.

366/003, 106, 107, 150.1, 162.4, 162.5, 167.1, 173.1, 173.2, 152.6, 153.1, 137/206; 222/394; 261/30, 37, 119.1;  
99/323.1



PCT

世界知的所有権機関  
国際事務局

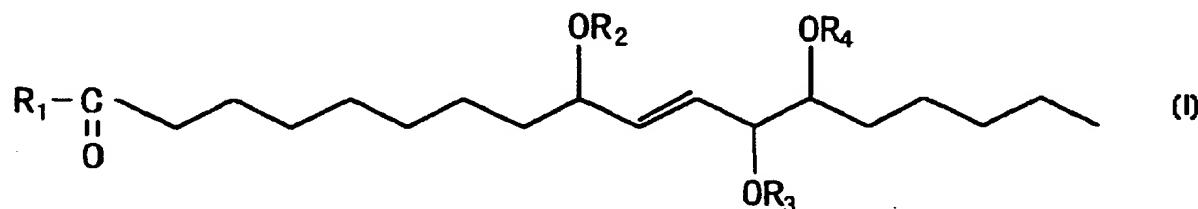
特許協力条約に基づいて公開された国際出願



(51) 国際特許分類7 A61K 39/39, 39/145, 39/15, 39/165, 39/21, 39/10, 39/05, 39/106, 39/108, 39/118, 39/00, 39/012, 39/015, A61P 31/14, 31/16, 31/18, 31/20, 31/04, 33/06, 33/02, 33/12, 33/10, 33/00	A1	(11) 国際公開番号 WO00/51634 (43) 国際公開日 2000年9月8日(08.09.00)
(21) 国際出願番号 PCT/JP00/01289		(81) 指定国 AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, 欧州特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), ARIPO特許 (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), ヨーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM)
(22) 国際出願日 2000年3月3日(03.03.00)		
(30) 優先権データ 特願平11/55732 1999年3月3日(03.03.99)	JP	(72) 発明者 ; および (73) 発明者／出願人 (米国についてのみ) 山田陽城(YAMADA, Haruki)[JP/JP] 清原寛寿(KIYOHARA, Hiroaki)[JP/JP] 永井隆之(NAGAI, Takayuki)[JP/JP] 〒108-8642 東京都港区白金5丁目9番1号 Tokyo, (JP) 社団法人 北里研究所 東洋医学総合研究所内 Tokyo, (JP)
(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsuhi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)		(74) 代理人 清水初志, 外(SHIMIZU, Hatsuhi et al.) 〒300-0847 茨城県土浦市御町1-1-1 関鉄つくばビル6階 Ibaraki, (JP)

(54) Title: VACCINE PREPARATIONS CONTAINING FATTY ACIDS AS CONSTITUENT

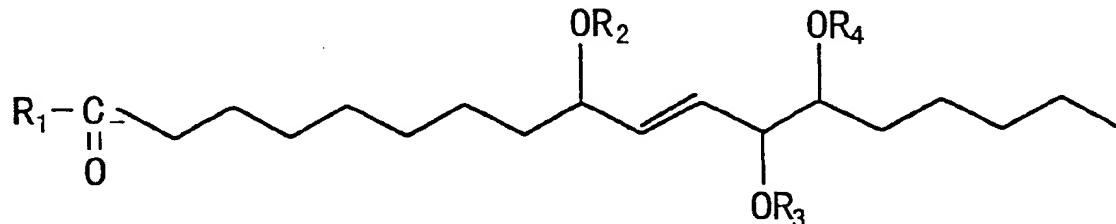
(54) 発明の名称 脂肪酸を構成成分とするワクチン製剤



## (57) Abstract

Adjuvants containing hydroxy unsaturated fatty acids and vaccines containing these adjuvants as the constituent. Namely, vaccines which show a sufficient immunopotentiating activity via the administration of hydroxy unsaturated fatty acids having, for example, the structural formula (I) are provided.

ヒドロキシ不飽和脂肪酸を含むアジュバント、並びにこのアジュバントを構成成分とするワクチンにより前記課題を解決する。例えば下記の構造を有するヒドロキシ不飽和脂肪酸の投与により、十分な免疫増強性を示すワクチンを提供する。



PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	DM	ドミニカ	KZ	カザフスタン	RU	ロシア
AG	アンティグア・バーブーダ	DZ	アルジェリア	LC	セントルシア	SD	スードン
AL	アルバニア	EE	エストニア	LI	リヒテンシュタイン	SE	スウェーデン
AM	アルメニア	ES	スペイン	LK	スリ・ランカ	SG	シンガポール
AT	オーストリア	FI	フィンランド	LR	リベリア	SI	スロベニア
AU	オーストラリア	FR	フランス	LS	レストロト	SK	スロバキア
AZ	アゼルバイジャン	GA	ガボン	LT	リトアニア	SL	シエラ・レオネ
BA	ボズニア・ヘルツェゴビナ	GB	英國	LU	ルクセンブルグ	SZ	セネガル
BB	バルバドス	GD	グレナダ	LV	ラトヴィア	TD	スウェーデン
BE	ベルギー	GE	グルジア	MA	モロッコ	TG	チーリー
BF	ブルキナ・ファソ	GH	ガーナ	MC	モナコ	TJ	タジキスタン
BG	ブルガリア	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TM	トルコメニスタン
BJ	ベナン	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TR	トルコ
BR	ブラジル	GR	ギリシャ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア共和国	TT	トリニダッド・トバゴ
BY	ベラルーシ	GW	ギニア・ビサオ	ML	マリ	TZ	タンザニア
CA	カナダ	HR	クロアチア	MN	モンゴル	UAG	ウクライナ
CF	中央アフリカ	HU	ハンガリー	MR	モーリタニア	UG	ウガンダ
CG	コンゴー	ID	インドネシア	MW	マラウイ	UZ	米国
CH	スイス	IE	アイルランド	MX	メキシコ	VN	ウズベキスタン
CI	コートジボアール	IL	イスラエル	MZ	モザンビーク	YU	ヴェトナム
CM	カメルーン	IN	インド	NE	ニジェール	ZA	ユーゴースラヴィア
CN	中国	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZW	南アフリカ共和国
CR	コスタ・リカ	IT	イタリア	NO	ノルウェー		ジンバブエ
CU	キューバ	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CY	キプロス	KE	ケニア	PL	ポーランド		
DZ	チエッコ	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
DK	ドイツ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DKK	デンマーク	KR	韓国				

## 明細書

### 脂肪酸を構成成分とするワクチン製剤

#### 技術分野

本発明は、ヒドロキシ不飽和脂肪酸を有効成分とするアジュバント、及びこれを構成成分とするヒトおよび動物の病気の予防または治療に有用なワクチン製剤に関するものである。

#### 背景技術

ワクチンは、種々の疾病の予防に用いられ、天然痘のような特定の疾患に対しては数々の輝かしい成果をあげてきた。しかしながら、ワクチンの副反応や、また効果が充分でないという例も多くあって、その改善が強く望まれている。現在、人体用または動物用に使用されているワクチンの多くは、病原体あるいは病原体の一部を取り出し、ワクチンの抗原材料として用いる。従って、病原体を構成する成分や病原体を増殖させる媒体の成分がワクチンに混入する可能性を否定できない。これはワクチン接種の際、望ましくない副反応を引き起こす原因となりうる。また、免疫賦与に働く抗原部位そのものも多量に接種されると副反応を誘発する場合もある。

このようなことをできるだけ避け、安全性に優れたワクチンを製造または使用する方法として、ワクチンの接種量を減少させることや、ワクチン抗原の純度を高めること、接種ルートを変えることなどが行われている。しかし、一般的には、このような変更に伴いワクチンの免疫力が低下しやすい問題点がある。このような免疫力の低下を防ぐために、アジュバントを用いることが実施してきた。しかし、ここでも、アジュバントの有効性と安全性の向上など、改善すべき課題が残っている。

例えば、インフルエンザウイルスなど、多くの病原微生物は気道粘膜を介して感染するので、感染初期段階で罹患を阻止するためには、血中よりも粘膜での局所免疫を強力に誘発するワクチンが望ましい。このためにも局所免疫を誘発しやすくするアジュバントが求められている。一方、注射以外の接種ルートとして注目されるのが、経口接種、あるいは経鼻接種である。注射は医療技術者が行わなければならぬので、例えば医療施設が完備されていない状況で多数の人にワクチン接種を進めるときには困難を伴いやすい。これに対して経口接種、あるいは経鼻接種では、ワクチン製剤さえ運搬すれば、専門家の指導の下に、直接の助けがなくとも接種が可能であると期待される。しかし、注射用ワクチンを別の接種ルートで接種すると一般的には充分な免疫刺激を得にくいため、やはり接種ルートに適したアジュバントが必要となる。

すなわち、有効かつ安全で、必要な部位で免疫を誘発しやすくする優れたアジュバントを開発することは、ワクチン開発にとって重要な課題である。

従来、ワクチンにはアジュバントとしてアルミニウム化合物（硫酸アルミニウム、水酸化アルミニウムなど）、リン酸化合物（リン酸カルシウム、リン酸アルミニウムなど）が広く用いられて来た。これらの化合物のゲルは、現在、人体用ワクチンに用い得るほど唯一のアジュバントである。しかし、これらのアジュバントにはいくつかの問題点があり、改善が求められている。それらを例示すれば、1) 製法、及び取り扱い上の問題として、製造のロットごとに品質が異なりやすいので、大量生産に向きでない、加えてカラム操作に馴染みにくい等取り扱い上も不便である、2) 効果上の問題として、液性免疫の誘発力に優れているものの、細胞性免疫の誘発力が低いので、用いる抗原に限界がある、などが挙げられる。

これらの改善を目的として、新しいアジュバントの研究、開発が進められている。それらを例示すれば次のものが挙げられる (J.C. Cox et al., Vaccine 15, 248 - 256, 1997)。

1. サポニン等、界面活性作用物質。
2. コレラトキシン等、細菌毒素。
3. BCG、ムラミルペプチド等、微生物または植物成分。
4. インターロイキンなど、サイトカイン類。
5. 合成ポリアニオン、ポリカチオンなど。
6. マイクロキャリアなど。

本発明者らは、数種の生薬から構成されている漢方薬の抽出液のあるものがアジュバント作用を有し、経鼻接種したインフルエンザワクチンの構成成分として用いた場合、鼻腔洗液中および血清中でインフルエンザウイルスに対する抗体価を上昇させることを明らかにしてきた [H. Yamada and T. Nagai, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 20 (3), 185-192, 1998]。しかし、アジュバント作用が抽出液中のいかなる化合物によってもたらされているのかについては、未だに明らかにされていなかった。

### 発明の開示

本発明の課題は、ワクチンの使用量を減らしたり接種ルートを変えても免疫力が低下しないようなワクチンを製造するため、ワクチンの免疫力を増強させる新しい方法を提供することにある。より具体的には、生薬中から、より単純な構造で有効性と安全性の高い化合物を見い出し、新規アジュバントとして開発することにある。漢方薬は中国、日本やアジア各国で長年の臨床使用を通じて有効性と安全性が確立されているので、本課題の材料として優れて好適である。

すなわち、本発明の課題は、効果と安全性の高い新規なアジュバントとして、ヒドロキシ不飽和脂肪酸およびその誘導体を提供し、かつ、これらを構成成分とするワクチンを提供し、有効で安全なワクチンの製造に貢献することである。

本発明者らは、8種の生薬から構成されている漢方薬「小青竜湯（しょうせいりゅうとう）」の熱水抽出液がアジュバント作用を有し、経鼻接種のインフルエン

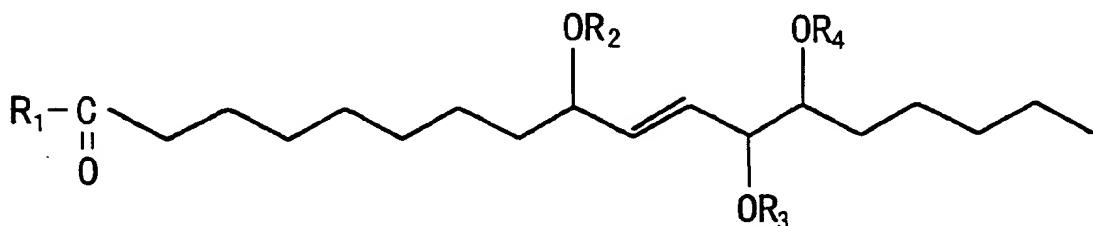
ザワクチンとともに経口投与した場合、鼻腔洗液中および血清中でインフルエンザウイルスに対する抗体価を上昇させることを既に明らかにしている [H. Yamada and T. Nagai, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 20 (3), 185-192, 1998]。

そこで本発明者らは、上記課題の達成を目的として、小青竜湯を構成する8種の生薬の個々の熱水抽出エキスをアジュバントとして経口投与し、経鼻接種インフルエンザワクチンに対するアジュバント活性を示すものの検索を行なった。その結果、生薬「半夏（ハンゲ）」の熱水抽出エキスが最も高いアジュバント活性を示すを見い出した。更にハンゲの熱水抽出エキス中の有効成分の分離精製と構造解析を進め、特定の構造を持った化合物に強力な免疫増強活性を見い出して本発明を完成させた。すなわち、上記の課題を達成する手段は、以下の本発明のアジュバント、並びにこのアジュバントを用いたワクチン製剤により実現される。

(1) ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体を含むアジュバント。

(2) ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体が、トリヒドロキシモノエノン構造を有する炭素数 18 の不飽和脂肪酸またはその誘導体である、(1) に記載のアジュバント。

(3) トリヒドロキシモノエン構造を有する炭素数18の不飽和脂肪酸またはその誘導体が下記の構造で示される 9,12,13-トリヒドロキシ-10E-オクタデセン酸(9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid)またはその誘導体である、(2)に記載のアジュバント。



〔式中、R1 は水酸基、あるいは 1 個または 2 個のアルキル基またはアリール基が

1 個の酸素、硫黄、または窒素原子に結合した構造の置換基であり、R2、R3、およびR4は同一または異なっていてもよい水素、アルキル基、またはアシル基を示す。]

(4) ヒドロキシ不飽和脂肪酸が生薬より調製したヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体である、(1)～(3)のいずれかに記載のアジュバント。

(5) (1)～(4)のいずれかに記載のアジュバントを構成成分とするワクチン製剤。

(6) ワクチン製剤中のアジュバントが免疫抗原成分と別に経口接種に用いられる、(5)に記載のワクチン製剤。

(7) ワクチン製剤中の免疫抗原成分が経鼻接種、皮下接種、経口接種、または筋肉内接種およびその他の粘膜を介した接種に用いられる、(6)に記載のワクチン製剤。

(8) 免疫抗原成分として、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻しんウイルス、風しんウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘルコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される单一または複数の病原微生物の抗原を含む、(5)から(7)のいずれかに記載のワクチン製剤。

(9) ワクチン製剤中のアジュバントを免疫抗原成分と別に経口投与する、(5)に記載のワクチン製剤の投与方法。

(10) 免疫抗原成分を経鼻接種、皮下接種、経口接種、筋肉内接種、またはその他の粘膜を介して接種する、(9)に記載のワクチン製剤の投与方法。

なお、本発明において「アジュバント」とは、免疫系を刺激して、抗原に対する免疫反応を高める物質を指す。

また、本発明において「アジュバントを構成成分とするワクチン製剤」といった場合には、アジュバントが免疫抗原成分などのワクチン製剤を構成しうる他の

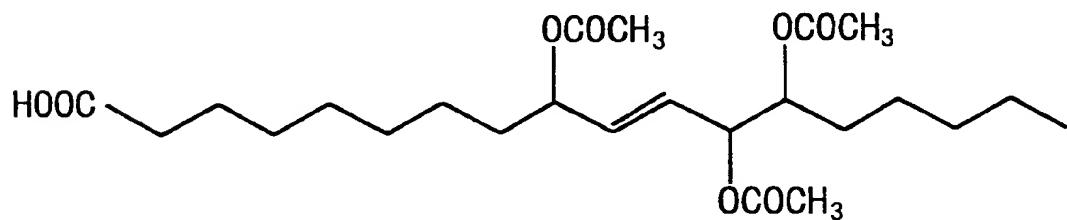
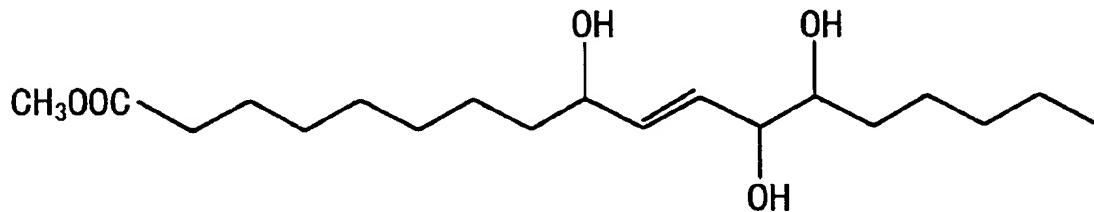
成分と混合されている場合のみならず、アジュバントが免疫抗原成分などのワクチン製剤を構成しうる他の成分と分離されている場合も含まれる。例えば、免疫抗原成分とアジュバントが別々の製剤として存在し、これらを別の経路で生体に投与する場合であっても、これらを併せてワクチン製剤と称する。

本発明のアジュバントは、ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体であることを特徴とする。アジュバントとして用いるヒドロキシ不飽和脂肪酸は、好ましくは、水酸基が3個および二重結合1個を有する（即ち、トリヒドロキシモノエン構造を有する）炭素数18の一連の化合物である。このような化合物は、脂肪酸上に水酸基および二重結合を有する点において脂肪酸アジュバントとして新規である。脂肪酸鎖上に存在する水酸基および2重結合はカルボン酸に帰属される炭素を除くいずれの位置にあってもよい。また、水酸基が各々の炭素上に一個ずつ結合する場合には、水酸基はRもしくはSで表示される立体配置をとるがそのいずれの場合でもよい。さらに、二重結合に対する置換基の結合様式によりEもしくはZで表示される立体配置をとるが、この場合もいずれの立体配置をとってもよい。

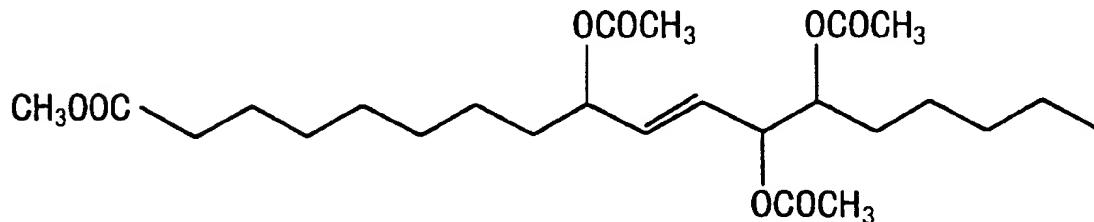
アジュバント活性発現のための望ましい水酸基および二重結合の位置を例示するならば、水酸基ではその位置が9,12,13であり、二重結合の位置およびその立体配置が10Eである。このような化合物としては、例えば、9,12,13-トリヒドロキシ-10E-オクタデセン酸(9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid)が含まれる。公表された文献上、本化合物についてはアンジオテンシン変換酵素に対する阻害活性やイネに対するファイトアレキシン作用が報告されただけで、ワクチンにおけるアジュバント活性は報告されていない((M. Maruno, J. Traditional Medicines, 14, 81-88, 1997; T. Kato, , Y. Yamaguchi, T. Uyehara, T. Yokoyama, T. Nama and S. Yamanaka, Naturwissenschaften, 70, 200, 1983; T. Kato, Y. Yamaguchi, N. Abe, T. Uyehara, T. Nama, M. Kodama and Y. Shiobara, Tetrahedron Lett., 26, 2357-2360, 1985)。

本発明のアジュバントには、上記脂肪酸の水酸基ならびにカルボン酸部分のカルボニル基に種々の置換基が結合した誘導体が含まれる。その例としては、水酸基にはアセチル基、ベンゾイル基、ビルビン酸基、コハク酸基などのアシル基が結合したエステル誘導体が、また、エチル基やメチル基などのアルキル基が結合したエーテル誘導体があげられる。また、カルボン酸性カルボニル基に結合する置換基の例としては水酸基、エチルオキシ基などアルキルオキシ基、ベンジルオキシ基などアリールオキシ基、チオエチル基などチオアルキル基、またはチオアリール基、アミノ基、一級アミン、あるいは二級アミンなどが挙げられる。

具体的な化合物としては、例えば、



、および



が挙げられる。

トリヒドロキシーモノエン構造を有するヒドロキシ不飽和脂肪酸が強いアジュバント活性を有することは、公知の文献には記載が無く、本発明者らの長年の研究によって初めて明らかにされた新しい知見である。また、次のとおり、先行文献の記述からは予測されないことである。

アジュバント活性を有する脂肪酸として構造が明らかとなっている化合物としては、リノール酸(linoleic acid)およびアラキドン酸(arachidonic acid)が公知である [H.K. Parmentier, M.G.B. Nieuwl and, M.W. Barwegen, R.P. Kwakkel and J.W. Schrama, *Poultry Science*, 76 (8), 1164-1171, 1997; D.S. Kelley, P.C. Taylor, G.J. Nelson, P.C. Schmidt, B.E. Mackey and D. Kyle, *Lipids*, 32 (4), 449-456, 1997]。まず、リノール酸は炭素数18であるが、二重結合が2個のジエン酸である点で本発明の化合物と異なり、水酸基を持たない点でも本発明の化合物とは明確に区別される。アラキドン酸は炭素数20、二重結合が4個の脂肪酸であり、また水酸基を持たない点でも本発明の脂肪酸とは異なる。

本発明のヒドロキシ不飽和脂肪酸が強いアジュバント活性を発揮するメカニズムは、現在不明である。但し、本発明者らは、漢方薬の小青竜湯を経口投与することにより、経鼻接種したインフルエンザワクチンに対して鼻腔中で抗インフルエンザウイルス IgA 抗体価を上昇させるアジュバント活性を示すことを明らかにしている [T. Nagai, M. Urata and H. Yamada, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 18(2), 193-208, 1996]。さらに本発明者らは、小青竜湯の経口投与により腸管の粘膜免疫系の誘導組織であるパイエル板のTリンパ球が活性化され、鼻腔領域リンパ球中のインフルエンザウイルス特異的 IgA 抗体産生細胞数を増加させることを明らかとしている [H. Yamada and T. Nagai, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 20(3), 185-192, 1998; T. Nagai and H. Yamada, *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 20(2), 267-281, 1998]。粘膜免疫系には共通粘膜免疫機構が存在し、生体内のいずれかの粘膜

免疫系が活性化されると、遠隔免疫により他の部位の粘膜免疫系も活性化されることが知られている。本発明のアジュバントであるヒドロキシ不飽和脂肪酸は、小青竜湯のアジュバント活性本体として同定されたものであることから、小青竜湯と同様に腸管粘膜免疫系を活性化することにより、鼻腔中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体産生を促進し、アジュバント活性を示す可能性が考えられる。

#### ヒドロキシ不飽和脂肪酸の製造

本発明に用いる脂肪酸は、天然物、例えば動物組織、生薬などの薬用植物、海藻、微生物培養物などを原料として公知の方法を組み合わせて、抽出、分離、精製し、製造することができる。また合成化学的手段により製造することもできる。その例を示せば次の通りである。

脂肪酸含有生薬であるハング (Pinellia ternata Breit. のコルク層を除いた根茎) をメタノールあるいはアセトンなどの有機溶媒で抽出し、抽出液より溶媒を留去し、その残留物を含水メタノールに溶解し、これを n-ヘキサン、石油エーテル等の低極性溶媒で抽出した後、含水メタノール層から溶媒を留去し、その残留物を水、メタノール、エタノール、クロロホルム、エーテル、n-ヘキサン、ベンゼン、酢酸エチルから選ばれる少なくとも一つを溶出溶媒として、セファデックス LH-20 などのセファデックス、ダイアイオン HP-20 などの多孔性ポリマー、アルミナまたはシリカゲル等を担体に用いたカラムクロマトグラフィーに 1 回または複数回付し、薄層クロマトグラフィーで目的成分を確認しながら分画することにより得ることができる。また、ハングを水などで抽出後、その水抽出液をエタノール沈殿やダイアイオン HP-20 などの多孔性ポリマーによる分画ならびにシリカゲルカラムクロマトグラフィーなどにより精製してもよい。また場合によってはアセトン、メタノール、エタノール等の適当な溶媒を用いて再結晶することにより精製してもよい。

さらに上記のようにして得られた化合物を必要に応じて、公知の化学的、または生物化学的、遺伝学的手法を適宜組み合わせてメチル化、エチル化、アセチル

化やベンゾイル化し、種々の誘導体を作成できる。

本発明の化合物の構造解析の方法としては、質量分析、核磁気共鳴スペクトルなどの公知の方法 [W. Herz and P. Kulanthaivel, *Phytochemistry*, 24 (1), 89-91, 1985; S. Ohnuma, T. Uehara, T. Namai, M. Kodama, Y. Shiobara, *Chemistry Letters*, 577-580 (1986); M. Hamberg, *Lipids*, 26, 407-415 (1991); I. Ohtani, T. Kusumi, Y. Kashman, H. Kakisawa, *J. American Chemical Society*, 113, 4092-4096 (1991); K. Kouda, T. Ooi, K. Kaya, T. Kusumi, *Tetrahedron Letters*, 37, 6347-6350 (1996); M. Kobayashi, T. Tawara, T. Tsuchida, H. Mitsuhashi, *Chemical Pharmaceutical Bulletin*, 38, 3169-3171 (1990)]を用いることができる。

### ワクチン

本発明によるアジュバントに基づいて、新規なワクチン製剤が提供される。本発明におけるワクチン製剤は、狭義と広義のワクチンを含む。すなわち、1) 人及び動物におけるウイルス、細菌、真菌、原虫、その他の微生物による感染症に有効な狭義のワクチンを含む。その一部を例示すれば、インフルエンザワクチン、百日せきワクチン、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン、日本脳炎ワクチン、A型肝炎ワクチン、B型肝炎ワクチン、ロタワクチン、麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチン、麻しん風しんおたふくかぜ混合ワクチン、麻しん風しん混合ワクチン、及びヘモフィルスインフルエンザワクチン等の各種ワクチンが挙げられる。さらには、多剤耐性黄色ブドウ状球菌 (MRSA) ワクチン、ヘリコバクターピロリ (以下 H. ピロリと省略する) ワクチン、出血性大腸菌 (E. HEC) ワクチン、サルモネラワクチン、クラミジアワクチン、マイコプラズマワクチン、エイズワクチン、マラリアワクチン、コクシジウムワクチン、あるいは住血吸虫ワクチンを含む。2) さらに広義のワクチンとして、がんワクチン、不妊ワクチン、胃潰瘍ワクチン、糖尿病ワクチン及び動脈硬化症ワクチンなど非感染症の予防や治療に有効なワクチンを含む。

これらのワクチンは製造方法により分類される種々のワクチンを含む。すなわち、弱毒化生ワクチン、不活化ワクチン、コンポーネントワクチン、DNA に基づくワクチンなどを含む。DNA に基づくワクチンの中には、プラスミドなどのキャリヤーに組み込んだ DNA 断片を含むワクチンのほか、リボザイムやアンチセンスオリゴヌクレオチドなどを併用するワクチンが含まれる。これらのワクチンは、治療用でも予防用でも良い。また、ワクチンの効果にとって有効な抗原成分を遺伝子組み換え技術を応用して組み換え生物細胞に生産させたものを用いる組み換えワクチンも含まれる。これらのワクチンは单味ワクチンでも混合ワクチンでも良い。これらのワクチンの製造方法や使用形態を例示すれば次の通りである。

インフルエンザワクチン；発育鶏卵、または、ベロ細胞など動物細胞培養技術により増殖させたウイルスをエーテル、界面活性化剤などで分解精製して得られる、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成によって得られる赤血球凝集素 (HA)、ノイラミニダーゼ (NA)、核蛋白質 (NP)、マトリックス蛋白質 (M) あるいはその一部などを含むスプリットワクチン、または、これらの蛋白質の遺伝子を含む DNA 断片をふくむ経鼻接種用 DNA ワクチン。

百日せきワクチン；百日せき菌を培養した培養液あるいは菌体より塩析、超遠心分離などを用いて抽出し、ホルマリンで無毒化した不活化ワクチン、または、遺伝子組み換え技術や変異剤処理で誘起した人工変異株生産物として得られる変異体の百日せき菌毒素 (PT)、赤血球凝集素 (FHA)、69K 膜タンパク質、あるいは、その部分ペプチドなどを含むワクチン。

百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン；百日せきワクチンにジフテリアトキソイド (DT) および破傷風トキソイド (TT) を混合した三種混合ワクチン。

日本脳炎ワクチン；マウス脳内で増殖したウイルス、またはベロ細胞など動物細胞培養技術により増殖したウイルスを超遠心分離あるいはエチルアルコールなどを用いてウイルス粒子を精製した後、ホルマリンで不活性化したもの、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成などによって得た抗原蛋白質を含むワクチン。

B型肝炎ワクチン；B型肝炎キャリアの血液を原材料とし、塩析、超遠心分離を用いてHBs抗原を分離精製したプラズマワクチン、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成などによって得た抗原部位などを含む組み換えワクチン。

麻しんワクチン；ニワトリ胚細胞などの培養細胞、またはペロ細胞など株化細胞培養技術により増殖させた弱毒ウイルス生ワクチン、あるいは、ウイルスの一部、または、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含む組み換えワクチン。

風しんワクチン；動物細胞またはヒト胎児細胞などの培養細胞、またはペロ細胞など株化細胞培養技術により増殖させたウイルス、あるいは、その一部、または、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含むワクチン。

おたふくかぜワクチン；家兎細胞などの培養細胞あるいは発育鶏卵で増殖させたウイルス、または、その一部、あるいは、遺伝子組み換え技術や化学合成によって得た感染防御抗原を含む弱毒生ワクチン。

麻しん風しん混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチンを混合した二種混合ワクチン。

麻しん風しんおたふくかぜ混合ワクチン；麻しんワクチン、風しんワクチン、おたふくかぜワクチンを混合した三種混合ワクチン。

ロタワクチン；MA104細胞など培養細胞で増殖させたウイルス、または患者の糞便中より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン。

エイズワクチン；培養細胞で増殖させたウイルス、または患者より得たウイルス、または、その一部、あるいは遺伝子組み換え技術や化学合成により得た感染防御抗原を含むワクチン、あるいは有効なDNA断片を含むDNAワクチン。

H. ピロリワクチン；培養したH.ピロリ菌体の破碎物、または、H.ピロリ培養物から分離したウレアーゼ、熱ショック蛋白質、トキシンなどを抗原とするワクチン、あるいは、遺伝子組み換え技術により生産されたこれらの抗原蛋白質か

らなる注射用あるいは経口、経鼻接種用ワクチン。

#### アジュバントの使用形態

本発明のアジュバントをワクチンの有効成分として用いる使用形態は特に限定されない。すなわち、公知の種々の適切な使用形態が可能であり、物理的混合や抗原蛋白との化学的結合物でもよいし、リポソームなどのキャリアーに内包させてもよい。

本発明のアジュバントは、公知のアジュバントの1種以上と同時に使用することができる。本発明のアジュバントと組み合わせるべき公知のアジュバントは、免疫原となる抗原の種類、接種する動物種、あるいは安全性等の考慮すべき条件に合わせて、好適な組み合わせを経験的に見い出すことができる。その結果、抗原の量を低下させたり、もう一方のアジュバントの量を低下させ、望ましくない副反応を低下させ、望ましい免疫反応を増強することができる。

#### アジュバントの混合法

本発明のワクチン製剤は、上記免疫原と本発明のアジュバントをそれぞれ別々に調製するか、または所定の量比で混合することにより調製される。本発明のワクチン製剤は、ワクチン抗原（免疫抗原成分）と本発明のアジュバントをそれぞれ別々に調製、製剤化しておき、実施例に示す通り、別々に投与するか、または、用時に混合してから接種するという方法によっても、効果を発揮させることができる。調製は厳密に無菌的に行なわなければならない。それぞれの原材料も完全に無菌的でなければならない。勿論、ワクチン作用以外に必要のないバイロジエンやアレルギー源となるような夾雜物質は可能な限り存在しない方が望ましい。その為に必要な方法は、この領域の専門家にとって公知である。

#### アジュバントの量比

本発明によるワクチン製剤におけるワクチン抗原（免疫抗原成分）とアジュバントの量比としては、例えば1:0.0001～1:10,000（重量比）を例示することができる。この範囲はあくまでも一般的な範囲であり、ワクチンの種類に応じて好適

な比率を決定して用いる。その為に必要な方法は、この領域の専門家にとって、公知である。

### ワクチンの性状

上記ワクチンは液状または粉末状で提供される。粉末状とする場合には、凍結乾燥等の手法により、粉末製剤とすることができます。液状製剤であれば、鼻腔内接種（鼻腔内スプレー、滴下、塗布など）、経口投与や注射に適している場合が多い。あるいは鼻腔内接種の場合は、粉末スプレー方式も可能である。また本発明によるワクチン製剤には、公知の安定剤や防腐剤を配合することができる。安定剤には、0.1～0.2%程度のゼラチンやデキストラン、0.5～1%のグルタミン酸ナトリウム、あるいは約5%の乳糖や約2%のソルビトール等が用いられる。防腐剤としては、0.01%程度のチメロサールや0.1%程度のβ-プロピオノラクトン、0.5%程度の2-フェノキシエタノールが公知である。

### ワクチン製剤の接種法

本発明によるワクチン製剤の使用方法は公知のど の方法も使用できる。

本発明のワクチン製剤においては、ワクチン抗原（免疫抗原成分）とアジュバント成分と混合して、全体として接種することもできるし、また、これら成分を別々に接種することもできる。接種は、好ましくは経口または経鼻で行われる。これら成分を別々に接種する場合には、例えば、ワクチン抗原（免疫抗原成分）を経鼻接種し、アジュバント成分を経口投与しても、免疫増強効果を発揮させることができる。

接種量はマウスの場合、鼻腔内で5μL～50μL、経口で0.05～0.5mL、ヒトの場合は鼻腔内投与の場合は0.1～1.0mL、経口の場合は1～100mLが好適である。これらの量は適宜変更し得る。また、免疫抗原との組み合わせについては、例えば、次に示す様な病原生物の免疫抗原では、ワクチン効果の点で、あるいは接種操作の点で、経鼻接種や経口接種が望ましいとされている。

インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻しんウイルス、風しんウイルス、

おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、H. ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア、マイコプラズマ、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫。

これらのワクチン抗原（免疫抗原成分）は、単独で接種される場合もあるし、百日せき・ジフテリア・破傷風三種混合ワクチン、あるいは麻しん・風しん二種混合ワクチンのような形で同時接種の形を採用することもできる。経鼻接種や経口接種が望ましい理由は、いずれも気道や消化管の粘膜が感染ルートとなっているためである。感染ルートである局所粘膜における免疫機構を誘導するためには、それに適した免疫誘導活性の強いアジュバントが望ましい。あるいは、マラリア原虫ワクチンのように必ずしも充分な医療設備の期待できない地域で使用される機会が多いワクチンについては、医師や看護婦といった専門の技術者でなくても接種が可能な経鼻接種や経口接種といった接種ルートが望まれる。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明のアジュバント、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acidの<sup>1</sup>H-NMRのパターンを示す図である。図中の「CD<sub>2</sub>HOD」は溶媒由来のシグナルを示す。

図2は、本発明のアジュバント、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acidの<sup>13</sup>C-NMRのパターンを示す図である。図中の「CD<sub>2</sub>HOD」は溶媒由来のシグナルを示す。

図3は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種したときの血清中の一次抗体産生の結果を示すグラフである。図中、縦軸は抗体価（ELISA 単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図4は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを用いたものを経鼻接種したときの鼻腔洗液中の二次抗体産生の結果を示すグ

ラフである。図中、縦軸は抗体価（ELISA 単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図 5 は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを経鼻接種し、アジュバントを経鼻投与したときの血清中の二次抗体産生の結果を示すグラフ。図中、縦軸は抗体価（ELISA 単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図 6 は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを経鼻接種し、アジュバントを経鼻投与したときの肺洗液中の二次抗体産生の結果を示したグラフ。図中、縦軸は抗体価（ELISA 単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図 7 は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを皮下接種し、アジュバントを経口投与したときの血清中の二次抗体産生の結果を示したグラフ。図中、縦軸は抗体価（ELISA 単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

図 8 は、本発明のワクチン製剤のうち、ワクチンとしてインフルエンザワクチンを皮下接種し、アジュバントを経口投与したときの鼻腔洗液中の二次抗体産生の結果を示したグラフ。図中、縦軸は抗体価（ELISA 単位）を、横軸は使用したアジュバントの種類を示す。

#### 発明を実施するための最良の形態

以下、本発明の実施例を示すが、本発明はこれらに限定されるものではない。

##### 実施例 1. ヒドロキシ不飽和脂肪酸の調製 - 1

9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid は公開特許公報（特開平 3-258775 号公報、「脂肪酸化合物類および該脂肪酸化合物類を有効成分とする抗圧剤」）に記載される方法に準じて製造した。

ハング 1kg をメタノールで加熱抽出し、抽出液から溶媒を減圧留去し、メタノールエキス 21.2g を得た。このメタノールエキスを 90%(v/v)メタノール-水混液 100mL に溶解した後、分液ロートに移し、n-ヘキサン 50mL を加えて軽く振り混ぜた後、静置した。下層を分取し、半量まで濃縮した後、これをダイアイオン HP-20 (三菱化成製) カラムを用いた疎水性クロマトグラフィーに付し、最初に水、次いで 50%(v/v)メタノール-水混合液、最後にメタノールで溶出を行った。このメタノール溶出部 530mg をセファデックス LH-20 (アマシャムファルマシアバイオテク社製) カラムクロマトグラフィー、次いでシリカゲルを用いた順相カラムクロマトグラフィー、 $\mu$ -Bondapak C18 (ウォーターズ社製) カラムを用いた逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を無色油状物質として得た。収量は 10mg であった。本油状物質の構造は原化合物およびその誘導体の質量分析や核磁気共鳴スペクトル (NMR)、比旋光度などにより決定した。本物質の<sup>1</sup>H-NMR および<sup>13</sup>C-NMR のパターンを図 1 および 2 に各々示す。

### 実施例 2. ヒドロキシ不飽和脂肪酸の調製 - 2

本発明の 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid をハングの熱水抽出エキスから調製した実施例を示す。

ハング 500g を水 10L を用いて液量が半量となるまで煎出し、抽出液をろ取した。残渣については再度同様の方法により煎出し、抽出液を合わせて凍結乾燥することにより熱水抽出エキスを得た (収率: 19.8%)。本熱水抽出エキスをメタノール 2.5L を用いて還流し、メタノール可溶性画分と不溶性画分を得た。不溶性画分について同様の操作を 2 回繰り返した。メタノール不溶性画分を再度水に溶解後、4 倍容量のエタノールを加えて一晩攪拌した後、沈殿と上清を分取した。沈殿はさらに分子量排斥限界 10,000 のセルロース製透析膜を用いて蒸留水に対して透析し、その後透析内液を凍結乾燥することにより非透析性画分を得た (収率: 0.6%)。この非透析性画分を水で溶解し、ダイアイオン HP-20 と共に攪拌後、ダイアイオ

ン HP-20 を水で洗浄することにより未吸着画分を除去した。ダイアイオン HP-20 はさらに 20%(v/v)、次いで 80%(v/v)-メタノール-水混液で順次洗浄することにより吸着物質を溶出させた後、メタノールを用いて吸着画分を溶出させ、メタノール溶出画分を得た（収率：0.06%）。このメタノール溶出画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーを用いて繰り返し分画することにより本発明の 9,12,13-tri hydroxy-10E-octadecenoic acid を得た。収量は 0.35mg であった。

また、ハング熱水抽出エキスのメタノール還流で得られたメタノール可溶性画分（45.4g）についても 200mL のメタノール-水混液（9:1）で溶解後、等量の n-ヘキサンで振とう抽出し、下層を得た。この下層の溶媒を減圧留去後、80% メタノール-水混液中でダイアイオン HP-20 と攪拌し、同溶媒でダイアイオン HP-20 を洗浄することにより未吸着画分を除去した。さらにダイアイオン HP-20 をメタノールを用いて溶出させることにより吸着画分を得た。本吸着画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーにより数回分画することにより本発明の 9,12,13-tri hydroxy-10E-octadecenoic acid (1.2mg) を得た。

ヒドロキシ不飽和脂肪酸がアジュバントとして有効であることを、公知の生物学的方法により確認した。ヒドロキシ不飽和脂肪酸が各種ワクチンに対し、抗体産生増強活性を有し、アジュバントとして有効であることを確認した実施例を以下に示す。

### 実施例 3. 鼻腔内接種されたインフルエンザ HA ワクチンの一次免疫に対する抗体産生促進作用

精製インフルエンザウイルス (A/PR/8/34) よりエーテル処理によって脂質成分を除去して HA ワクチン（タンパク質量として 1mg/mL）を調製した。実施例 1 に記載した方法で精製した 9,12,13-tri hydroxy-10E-octadecenoic acid の水性溶液を調製し、ヒドロキシ不飽和脂肪酸溶液とした。なお、ここで用いた 9,12,13-tri hydroxy-10E-octadecenoic acid の純度は、約 95% 以上であった。BALB/c マウス（雌性、7 週齢）に本ヒドロキシ不飽和脂肪酸水溶液をマウスの体重当たり 5

0  $\mu\text{g}/\text{kg}$  の用量で 5 日間経口ゾンデを用いて胃内強制投与した。ヒドロキシ不飽和脂肪酸の経口投与開始 3 日目にマウスをアモバルビタールナトリウムで麻酔し、右側鼻腔にマイクロピペットで 10  $\mu\text{L}$  のワクチンを滴下した。2 週間後、マウスの眼底静脈叢より採血し、血清を調製した。血清中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体価は酵素免疫測定法 (ELISA) により測定した。血清は 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したプロテイン G セファロースカラム 4FF (アマシャムファルマシアバイオテク社製) にのせ、カラムを 20 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) で洗浄することにより未吸着画分を得た。

抗インフルエンザウイルス IgA 抗体の定量の際には、コーティング緩衝液 (10 mM 炭酸-重炭酸ナトリウム緩衝液 pH 9.6) に懸濁した HA ワクチン (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) 10  $\mu\text{l}$  で、先ず 96 穴の EIA プレートの各孔 (well) をコートした。室温に 2 時間放置後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS)- 0.05% ツイーン 20 でプレートを洗浄した。次に、非特異反応を抑制する目的で、ブロッキング溶液 [1% 牛血清アルブミン (BSA) および 0.1%  $\text{NaN}_3$  を含む PBS] 300  $\mu\text{L}$  で各孔をコートした。4°C に一晩放置後、PBS-ツイーン 20 で洗浄し、各孔に 100  $\mu\text{L}$  ずつブロッキング溶液で希釈した検査試料を加えた。抗インフルエンザウイルス IgA 抗体の定量の際には、血清のプロテイン G セファロースカラム未吸着画分を試料として用いた。室温に 2 時間放置後、PBS-ツイーン 20 でプレートを洗浄した。次に各孔にブロッキング溶液で希釈したアルカリホスファターゼ標識山羊抗マウス IgA  $\alpha$ 鎖特異抗体 (ザイメットラボラトリーズ社製) を 100  $\mu\text{L}$  ずつ加えた。室温に一晩放置後、PBS-ツイーン 20 で洗浄した。最後に、各孔に 10% ジエタノールアミン緩衝液 (pH 9.8) に溶解した p-ニトロフェニルリン酸 (1 mg/mL; 和光純薬工業株式会社製) を加えて発色させた。37°C で 20~30 分放置後、発色をマイクロプレートリーダーで O.D. (405 nm) を測定した。

図 3 は 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の血清中の抗インフルエンザウイルス抗体価に対する影響を示したものであるが、ワクチンを経鼻接種し、

アジュバントを含まない水性溶媒を経口投与した場合には、低いレベルの抗体しか検出されなかった。しかし、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を経口投与した場合、強く血清中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体価を上昇させた。以上の結果は、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の経口投与により、経鼻接種したインフルエンザ HA ワクチンに対する血中での抗体産生が増強されることを示している。

#### 実施例4. インフルエンザ HA ワクチンの二次免疫に対する抗体産生促進作用

実施例3に記載した方法と同様にしてインフルエンザ HA ワクチンと 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の水性溶液を調製した。雌性、7週齢の BALB/c マウスに試料溶液をマウスの体重当たり 50 μg/kg の用量で 1~5 日間経口ゾンデを用いて胃内強制投与により経口投与した。9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の経口投与開始当日もしくは3日目にマウスにアモバルビタールナトリウムを腹腔内投与して麻酔し、ワクチン 10 μL (1-5 μg/マウス) をマウスに経鼻接種した。マウスを約3週間飼育後、ワクチンのみをさらに二次経鼻接種するもしくは、ワクチンを二次接種し、ヒドロキシ脂肪酸を経口投与した。さらに2週間飼育後、鼻腔洗液を調製した。鼻腔洗液は、マウスの左右の鼻腔より 2mL の 0.1% BSA を含む PBS を灌流することによって回収した。鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体価は ELISA により測定した。

図4は 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の二次応答による鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体産生に対する影響を示したものである。ワクチンを経鼻接種し、アジュバント無投与のときには、低いレベルの抗インフルエンザウイルス IgA 抗体しか検出されなかった。これに対し 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を経口投与したグループでは強く鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体価を上昇させた。

次に、アジュバント特異的抗体 (IgG, IgA) および IgE の検出を行った。ヒドロキシ不飽和脂肪酸とキャリアタンパク質である牛血清アルブミンとの結合物を

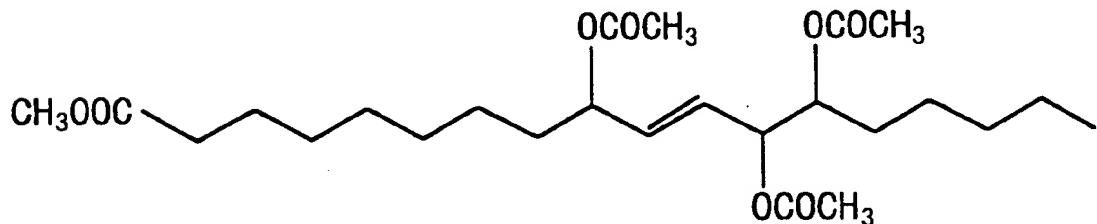
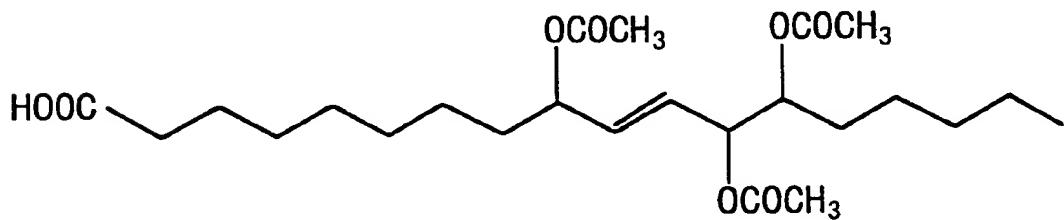
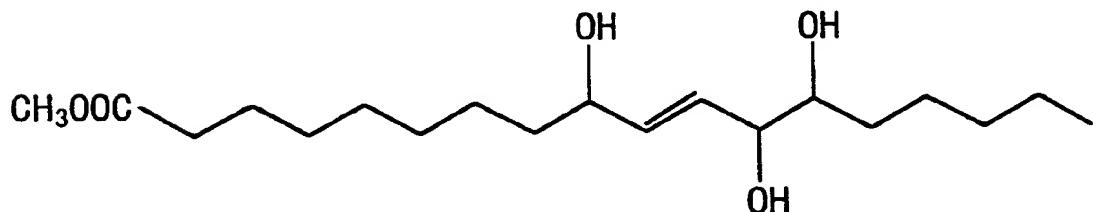
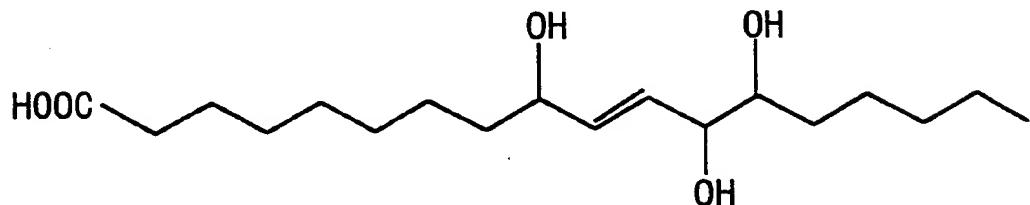
調製し、この溶液 (1 $\mu$ g/ml) 100 $\mu$ l で、先ず 96 穴の EIA プレートの各孔 (well) をコートした。次いで、非特異的反応を抑制する目的で、ブロッキング溶液 (5% スキムミルクを含む PBS) 300 $\mu$ l でプレートの各孔を 1 時間コートした。その後、種々の濃度に希釈した検体 (鼻腔洗液) 100 $\mu$ l を各孔に添加して 1 時間抗原抗体反応を行い、PBS-0.05% ツイーン 20 で 3 回洗浄した。これに二次抗体としてベルオキダーゼ標識抗マウス IgG、IgA または IgE 抗体 (1:1000) 100 $\mu$ l を添加して 1 時間反応させた。PBS-ツイーン 20 で 3 回洗浄後、基質溶液 (0.003% 過酸化水素水、ABTS 0.3mg/ml を含む 0.1M クエン酸緩衝液 pH4) 100 $\mu$ l を加え、15 分間インキュベートして発色させた。マイクロプレートリーダーを用いて O.D. (405nm) を測定した。その結果、ヒドロキシ不飽和脂肪酸を経鼻投与したマウスと投与していないコントロールマウスで、鼻腔洗液において吸光度に差は認められなかった。この結果より、アジュバント特異的抗体 (IgG, IgA) および IgE は検出されなかった。

上記のように、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid により抗インフルエンザウイルス IgA 抗体値が上昇した結果は、ワクチンの一次接種時に経口投与された 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid が、ワクチンの二次接種による気道における抗体産生を強く誘導する作用があることを示している。即ち、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid が HA ワクチンに対するメモリー効果を強く誘導する作用があることを示している。用いたヒドロキシ脂肪酸は低分子化合物であることから予想されるとおり、免疫原性は低く、副反応惹起性が低いことが示唆された。

#### 実施例 5. ヒドロキシ不飽和脂肪酸の毒性

実施例 1 で調製したヒドロキシ不飽和脂肪酸 (1)(9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid)、およびこれから調製したメチルエステル誘導体 (2)(methyl 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoate)、トリアセチル誘導体 (3)(9,12,13-tri acetoxy-10E-octadecenoic acid)、トリアセチルメチルエステル誘導体 (4) (met

hyl 9,12,13-triacetoxy-10E-octadecenoate) をマウスに投与し、急性毒性を調べた。(1)～(4)の化合物の化学構造式を順に以下に示す。



化合物(2)(methyl 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoate)は、化合物(1)(9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid)をエーテルに溶解後、過剰量のジアゾメタン-エーテル溶液を加えて数分間室温で反応させた。反応溶液から溶媒を留去し(2)を得た。

化合物(3)(9,12,13-triacetoxy-10E-octadecenoic acid)は、化合物(1)(9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid)を酢酸ナトリウム存在下、無水酢酸中で約1時間還流後、反応生成物をクロロホルム-水で分配抽出し、クロロホルム層より(3)を得た。

化合物(1)より化合物(2)を合成後、(3)を合成する方法を用いて変換し、化合物(4)(methyl 9,12,13-triacetoxy-10E-octadecenoate)を得た。

(1)～(4)の化合物(純度95%以上)は30mg/kgの腹腔投与と100mg/kgの経口投与において毒性の兆候を示さなかった。

実施例6. 百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン(経鼻)－ヒドロキシ不飽和脂肪酸(経口) 製剤

20μL中に百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンを蛋白質窒素として50μg含むように調製した。また、PBSに溶解し瀘過滅菌した9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid 10μgを0.5mL中に含むように調製した。これらに防腐剤(0.005%チメロサール)を加え、容器に分注して、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチン(経鼻)－ヒドロキシ不飽和脂肪酸(経口)接種剤とした。本品は10°C以下の冷暗所に保存した。

上記のように調製した百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンをマウスの鼻腔内に接種し、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acidをその前後に経口投与した。さらに4週間後に同量のワクチンを追加接種し、抗体産生を調べた。試験成績から、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンのみを接種された対照群のマウスでは、血中の抗百日せき毒素(PT)-IgG抗体は、156 ELISA単位、抗ジフテリアトキソイド(DT)-IgG抗体は、11 ELISA単位、抗破傷風トキソイド(TT)-IgG抗体は、13 ELISA単位であったのに対し、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acidを併用経口投与したものでは、血中の抗PT-IgG抗体は、442 ELISA単位、抗DT-IgG抗体は、70 ELISA単位、抗TT-IgG抗体は、75 ELISA単位であった。また、百日せきジフテリア破傷風混合ワクチンのみを接種された対照群のマ

ウスでは、鼻腔洗液中の抗 PT-IgA 抗体は、6 ELISA 単位、抗 DT-IgA 抗体は、3 ELISA 単位、抗 TT-IgA 抗体は、4 ELISA 単位であったのに対し、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を併用したワクチンでは、鼻腔洗液中の抗 PT-IgA 抗体は、14 ELISA 単位、抗 DT-IgA 抗体は、11 ELISA 単位、抗 TT-IgA 抗体は、11 ELISA 単位であった。

実施例 7. 麻しん風しん混合ワクチン（経鼻）－ヒドロキシ不飽和脂肪酸（経口）製剤

麻しん風しん混合ワクチンを、20μL 中に各々のワクチン 7μg 相当量のウイルス粒子を含むように調製した。また、PBS に溶解し瀘過滅菌した 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を 0.5mL 中に 2.5μg 含むように調製した。これらに安定剤（0.2%豚製ゼラチン、0.1%グルタミン酸ナトリウム、5%乳糖）を加え、容器に分注して、麻しん風しん混合ワクチン－ヒドロキシ不飽和脂肪酸点鼻、経口剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存した。

上記のように調製した麻しん風しん混合ワクチンを 3 週間隔で 2 回マウスに投与し、1 回目の接種の前後にだけ 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を経口投与して、血中の抗体産生をみた。試験成績から、ワクチンのみを接種した場合に産生される ELISA 抗体価は麻しん、風しんのそれぞれは、0.14、0.09 であったのに対し、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid 併用ワクチンは、各々 0.30、0.29 であった。

実施例 8. ロタワクチン－ヒドロキシ不飽和脂肪酸エステル製剤（経口、点鼻剤）の調製

20μL 中にロタワクチン 3.3μg 相当量のウイルス粒子を含むように調製した。また、実施例 5 で用いたメチルエステル誘導体 (2)(methyl 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoate) を PBS に溶解し、0.5mL 中に 10μg 含むように調製し、瀘過滅菌した。これを容器に分注して、ロタワクチン－ヒドロキシ不飽和脂肪酸経口、点鼻剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存した。

上記のように調製したロタワクチンを 3 週間隔で 2 回マウスに接種し、1 回目の接種の前後にだけメチルエステル誘導体を経口投与して、血中の抗体産生をみた。試験成績から、ワクチンのみを接種した場合に產生される ELISA 抗体価は、ワクチン点鼻接種の場合、0.089 であったのに対し、メチルエステル誘導体併用ワクチンは、0.38 であり、また、ワクチンも経口接種の場合、アジュバント無接種対照群マウスでは 0.018 であったのに対し、メチルエステル誘導体添加ワクチン接種群では、0.27 であった。

#### 実施例 9. マイコプラズマワクチンーヒドロキシ不飽和脂肪酸製剤（点鼻、経口剤）の調製

20  $\mu$ L 中にマイコプラズマワクチン  $2.0 \times 10^{10}$  CFU (コロニー形成単位) 相当量のウイルス粒子を含むように調製した。また、PBS に溶解し濾過滅菌した 9,12, 13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を 0.5mL 中に 10  $\mu$ g 含むように調製した。これらを容器に分注して、マイコプラズマワクチンーヒドロキシ不飽和脂肪酸製剤点鼻、経口剤とした。本品は 10°C 以下の冷暗所に保存した。

上記のように調製したマイコプラズマワクチンを 2 週間隔で 3 回マウスに経鼻投与し、1 回目の接種の前後にだけ 9,12, 13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を経口投与して、マイコプラズマ感染攻撃後病変をみた。試験成績から、ワクチンのみを投与された対照群のマウスは 10 匹すべてに病変が認められたのに対し、9,12, 13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を併用したものでは 10 匹当たり 3 匹のみに病変が認められた。病変数の平均値では、ワクチンのみでは 302 であったのに対し、9,12, 13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid 併用ワクチンでは 178 であった。

#### 実施例 10. インフルエンザ HA ワクチンの経鼻接種による二次免疫に対する経鼻投与による抗体産生促進作用

実施例 3 に記載した方法と同様にしてインフルエンザ HA ワクチン(タンパク質量として 0.1mg/mL) を調製した。これに、試料の PBS 溶液 (0.1mg/mL) を等量混

合し、接種材料を調製した。雌性、7週齢の BALB/c マウスにアモバルビタールナトリウムを腹腔内投与して麻酔し、両側の鼻腔に接種材料を 10  $\mu$ L ずつ接種した。マウスを 3 週間飼育後、ワクチンと試料の混合液をさらに二次経鼻接種した。さらに 16 日間飼育後、血清および肺洗液を調製した。肺洗液は、放血後のマウスの気管から 2mL の 0.1% BSA を含む PBS を注入し、肺を 2 回灌流することによって回収した。血清および肺洗浄液中の抗インフルエンザウイルス IgG 抗体価は ELISA により測定した。

抗インフルエンザウイルス IgG 抗体の定量の際には、コーティング緩衝液 (BSA 10  $\mu$ g/mL を含む 10mM 炭酸-重炭酸ナトリウム緩衝液 pH9.6) で希釈した抗マウス IgG モノクローナル抗体 (mAb) (ファーミンジエン社製) 100  $\mu$ L で、先ず 96 穴の EIA プレートの各孔 (well) をコートした。37°Cで 3 時間放置後、各孔の液を捨て、非特異的結合を抑制する目的で、ブロッキング溶液 (1%スキムミルクおよび 0.1%NaN<sub>3</sub> を含む PBS) 300  $\mu$ L で各孔をコートした。37°Cで 1 時間放置後、PBS-ツイーン 20 で洗浄し、各孔に 100  $\mu$ L ずつブロッキング溶液で希釈した検査試料を加えた。室温に一晩放置後、PBS-ツイーン 20 でプレートを洗浄した。次に各孔にブロッキング溶液で希釈したビオチン標識 HA ワクチン (1  $\mu$ g/ mL) を 100  $\mu$ L ずつ加えた。振蕩しながら室温に 1 時間放置後、PBS-ツイーン 20 で洗浄した。次に、各孔にブロッキング溶液で希釈したストレプトアビジン- $\beta$ -ガラクトシダーゼを 100  $\mu$ L ずつ加えた。振蕩しながら室温に 1 時間放置後、PBS-ツイーン 20 で洗浄した。さらに、各孔に 0.1M NaCl、1mM MgCl<sub>2</sub>、0.1% BSA および 0.1% NaN<sub>3</sub> を含む 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH7.0) に溶解した 0.1mM 4-メチルウンベリフェリル- $\beta$ -ガラクトシド (シグマ社製) を 100  $\mu$ L ずつ加え、37°Cで 2 時間放置した。最後に、各孔に 0.1M グリシン-NaOH 緩衝液 (pH10.3) を 100  $\mu$ L ずつ加え、蛍光プレートリーダー (フロウラボラトリーズ社製) で蛍光 (Ex. 355 nm, Em. 460 nm) を測定した。

図 5 は 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の二次応答による血清中

の抗インフルエンザウイルス IgG 抗体産生に対する影響を示したものである。9, 12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid はマウス 1 匹当たり 1 $\mu$ g の用量で血清中の抗インフルエンザウイルス IgG 抗体価を HA ワクチン単独の場合よりも上昇させた。

図 6 は 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の二次応答による肺洗液中の抗インフルエンザウイルス IgG 抗体産生に対する影響を示したものである。ワクチンのみを鼻腔内接種したときには、低いレベルの抗インフルエンザウイルス IgG 抗体しか検出されなかった。これに対し、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid とワクチンを接種したグループではそれぞれマウス 1 匹当たり 1 $\mu$ g の用量で肺洗液中の抗インフルエンザウイルス IgG 抗体価を有意に上昇させた。

これらの結果は、アジュバントとして用いられた 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid が、経鼻投与においても血清中および肺中で抗体産生を誘導する作用があることを示している。

#### 実施例 11. インフルエンザ HA ワクチンの皮下接種による二次免疫に対する経口投与による抗体産生促進作用

実施例 3 に記載した方法と同様にしてインフルエンザ HA ワクチン(タンパク質量として 10 $\mu$ g/mL)と試料の水性溶液を調製した。雌性、7 週齢の BALB/c マウスに試料溶液をマウス 1 匹当たり 1 $\mu$ g の用量で経口ゾンデを用いて胃内強制投与により経口投与し、ワクチン 0.1mL を腹部に皮下接種した。マウスを 2 週間飼育後、同様に試料を経口投与し、ワクチンを二次皮下接種した。さらに 10 日間飼育後、血清および鼻腔洗液を調製した。血清および鼻腔洗浄液中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体価は ELISA により測定した。抗インフルエンザウイルス IgA 抗体の定量の ELISA はキャプチャーアンチ体として抗マウス IgA mAb (ファーミンジエン社製) を用いた以外は実施例 10 と同様にして行なった。

図 7 は 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の二次応答による血清中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体産生に対する影響を示したものである。9,

12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid はマウス 1 匹当り 1  $\mu$ g の用量で血清中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体価を HA ワクチン単独の場合よりも有意に上昇させた。また、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid のアジュバント活性は陽性対照として用いた同用量の CTB と同程度であった。

図 8 は 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid の二次応答による鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体産生に対する影響を示したものである。ワクチンのみを皮下接種し、アジュバント無投与のときには、低いレベルの抗インフルエンザウイルス IgA 抗体しか検出されなかった。これに対し、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid を経口投与したグループではマウス 1 匹当り 1  $\mu$ g の用量で鼻腔洗液中の抗インフルエンザウイルス IgA 抗体価を有意に上昇させた。また、9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid のアジュバント活性は陽性対照として用いた同用量の CTB と同程度であった。

これらの結果は、アジュバントとして用いられた 9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid が、経口投与により皮下接種ワクチン（現行ワクチン）に対しても血清中および鼻腔中で抗体産生を誘導する作用があることを示している。

### 産業上の利用の可能性

以上の実施例により、本発明の効果として、次のことが明らかである。

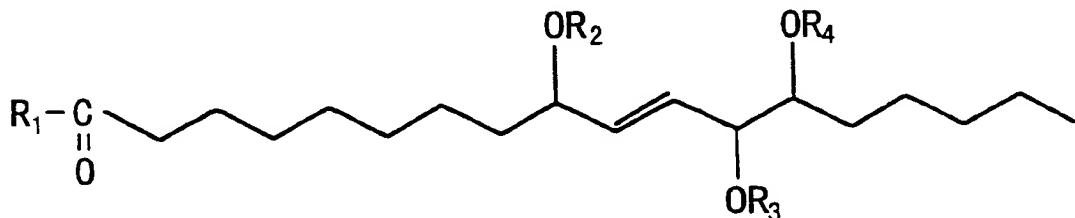
1. ヒドロキシ不飽和脂肪酸で構成される本発明のアジュバントは、経口投与することにより経鼻接種や皮下接種したインフルエンザ HA ワクチン等に対する抗体産生を増強する。
2. 本発明のアジュバントを経口投与し、ワクチン抗原を鼻腔や皮下ルートで接種すると、血中の抗体産生と共に局所（鼻腔）の抗体産生も増強される。すなわち、本発明のアジュバントを使用することによって、ワクチン抗原の接種量を減少させることができ、副反応の軽減につながる。
3. ヒドロキシ不飽和脂肪酸の毒性は低く、また免疫原性も低いので、本発明の

アジュバントを併用するワクチンは、安全性の高いワクチンである。

以上に説明したように、本発明によるアジュバントを構成成分とするワクチン  
製剤は、ワクチンによるウイルスおよび細菌感染の予防あるいは治療に有効な薬  
剤として期待される。

## 請求の範囲

1. ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体を含むアジュバント。
2. ヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体が、トリヒドロキシモノエン構造を有する炭素数 18 の不飽和脂肪酸またはその誘導体である、請求項 1 に記載のアジュバント。
3. トリヒドロキシモノエン構造を有する炭素数 18 の不飽和脂肪酸またはその誘導体が下記の構造で示される 9,12,13-トリヒドロキシ-10E-オクタデセン酸 (9,12,13-trihydroxy-10E-octadecenoic acid) またはその誘導体である、請求項 2 に記載のアジュバント。



[式中、R1 は水酸基、あるいは 1 個または 2 個のアルキル基またはアリール基が 1 個の酸素、硫黄、または窒素原子に結合した構造の置換基であり、R2、R3、および R4 は同一または異なっていてもよい水素、アルキル基、またはアシル基を示す。]

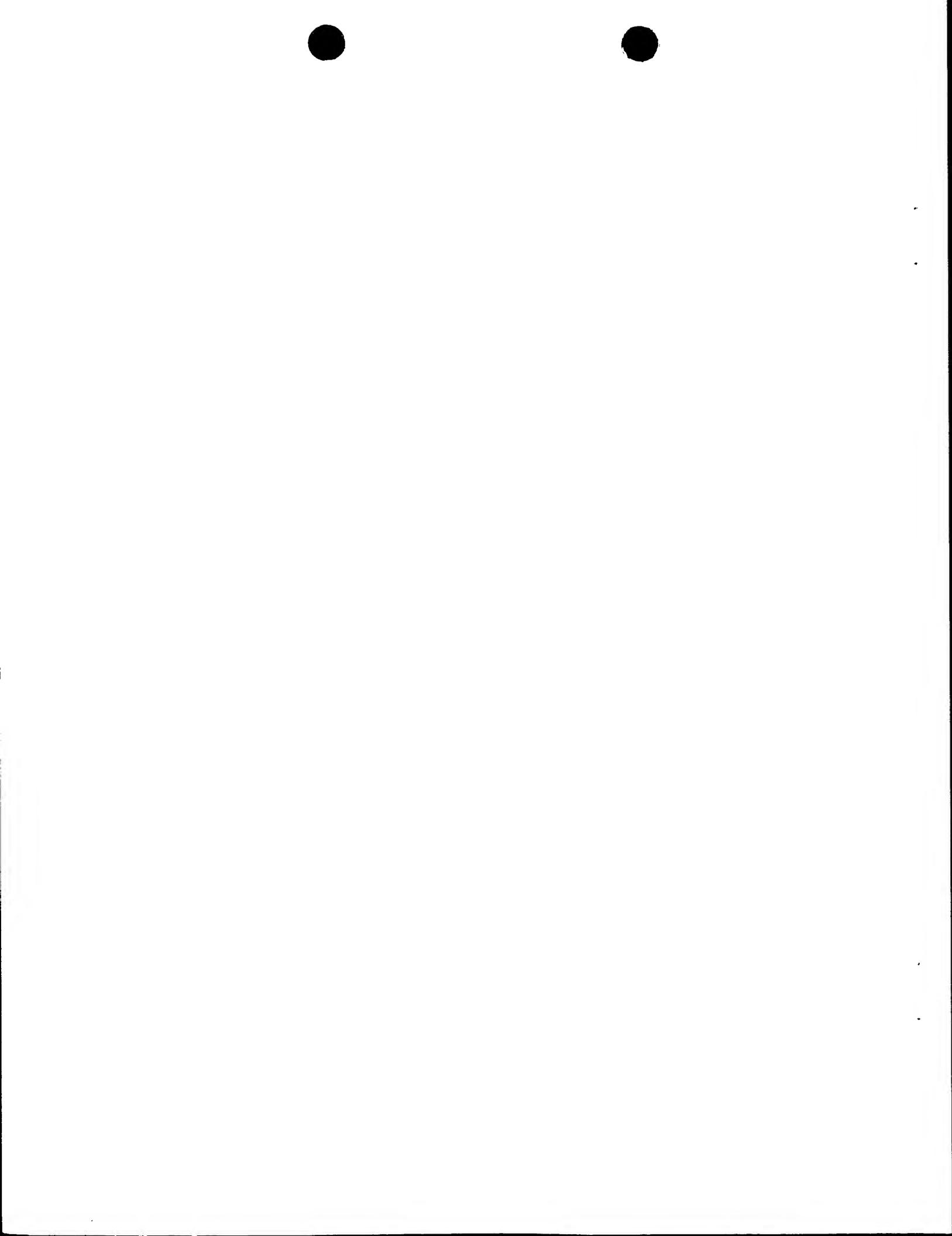
4. ヒドロキシ不飽和脂肪酸が生薬より調製したヒドロキシ不飽和脂肪酸またはその誘導体である、請求項 1～3 のいずれかに記載のアジュバント。
5. 請求項 1～4 のいずれかに記載のアジュバントを構成成分とするワクチン製剤。
6. ワクチン製剤中のアジュバントが免疫抗原成分と別に経口接種に用いられる、請求項 5 に記載のワクチン製剤。
7. ワクチン製剤中の免疫抗原成分が経鼻接種、皮下接種、経口接種、筋肉内

接種、またはその他の粘膜を介した接種に用いられる、請求項 6 に記載のワクチン製剤。

8. 免疫抗原成分として、インフルエンザウイルス、ロタウイルス、麻しんウイルス、風しんウイルス、おたふくかぜウイルス、エイズウイルス、百日せき菌、ジフテリア菌、ヘルコバクター・ピロリ菌、出血性大腸菌(EHEC)、クラミジア原虫、マイコプラズマ原虫、マラリア原虫、コクシジウム原虫、および住血吸虫で構成される群から選択される单一または複数の病原微生物の抗原を含む、請求項 5 から 7 のいずれかに記載のワクチン製剤。

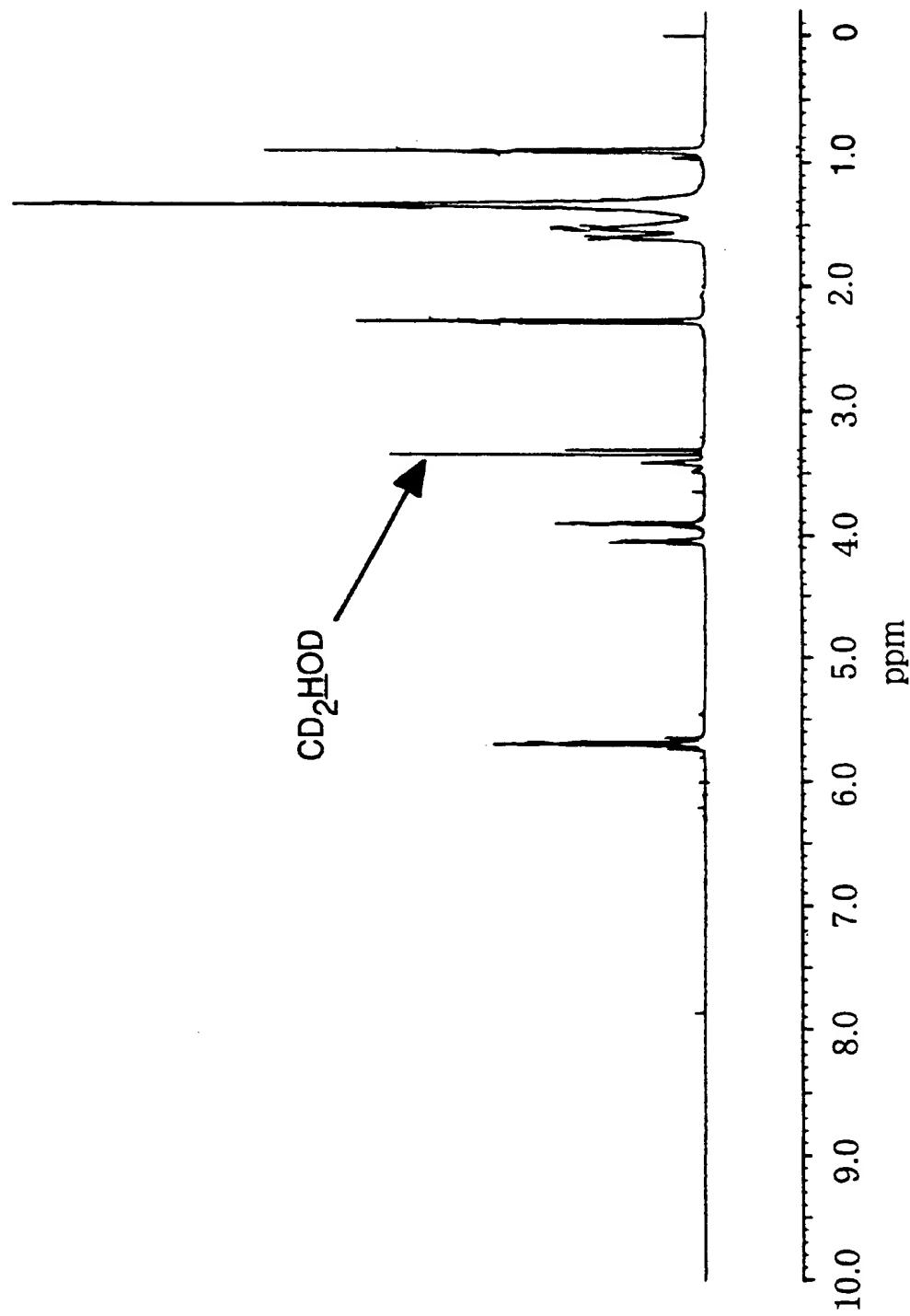
9. ワクチン製剤中のアジュバントを免疫抗原成分と別に経口投与する、請求項 5 に記載のワクチン製剤の投与方法。

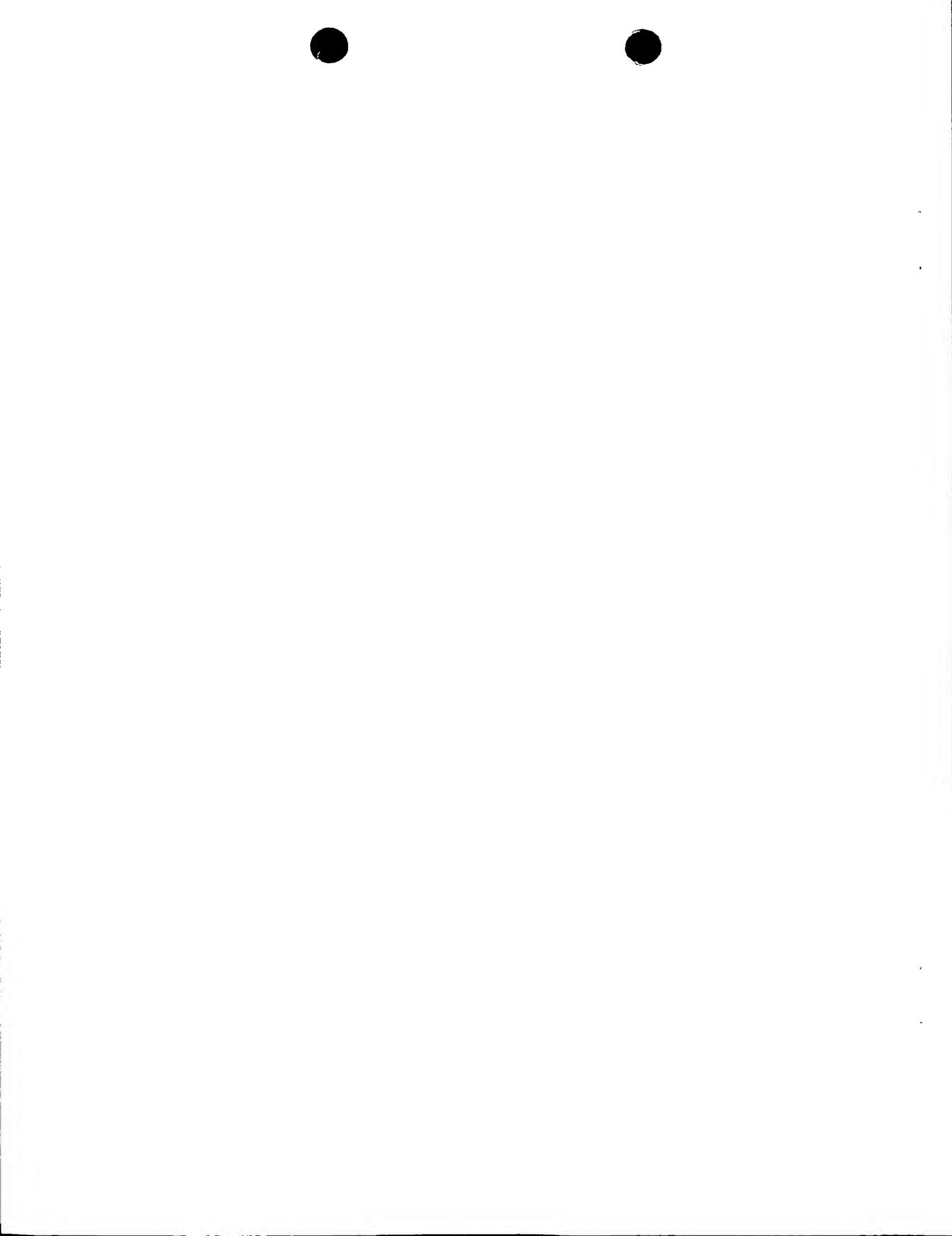
10. 免疫抗原成分を経鼻接種、皮下接種、経口接種、筋肉内接種、またはその他の粘膜を介して接種する、請求項 9 に記載のワクチン製剤の投与方法。



1 / 8

図 1





2 / 8

図 2

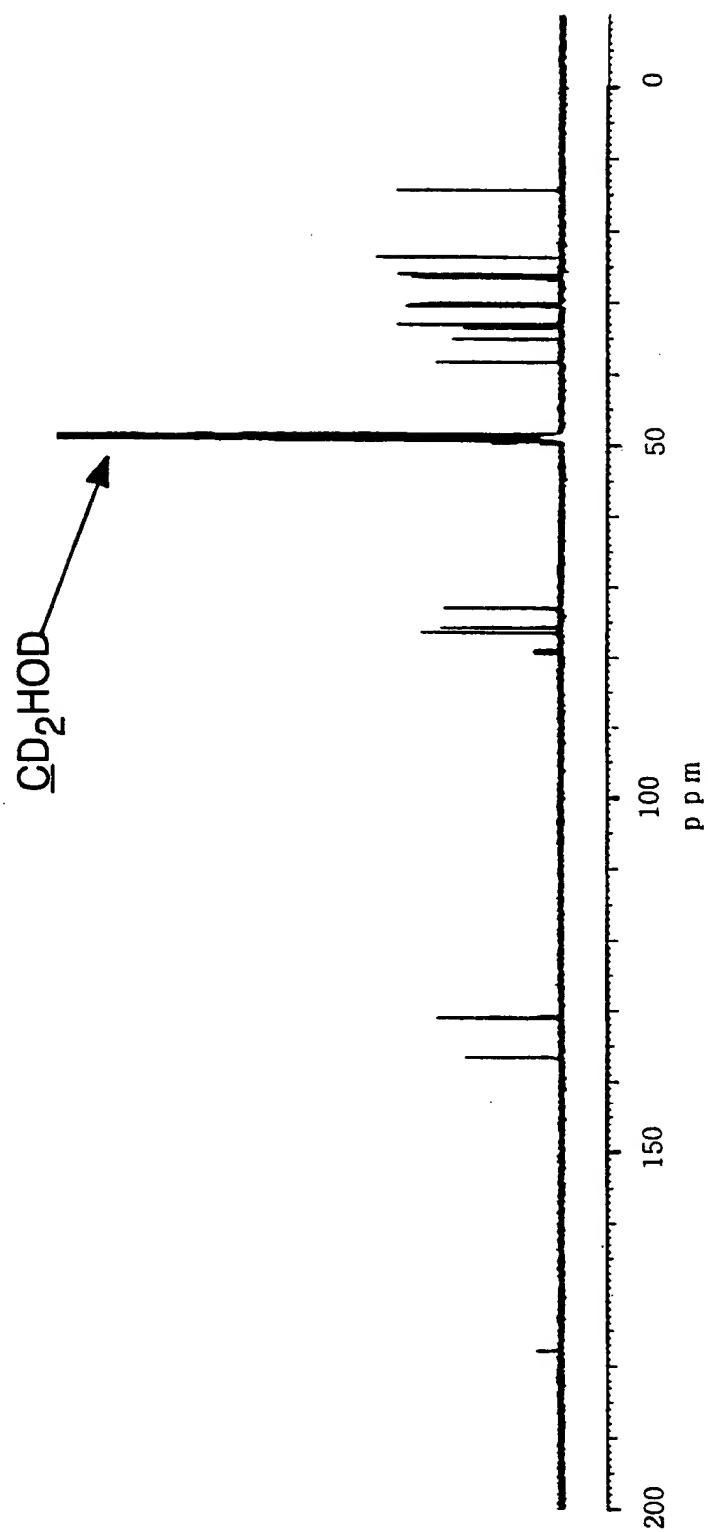
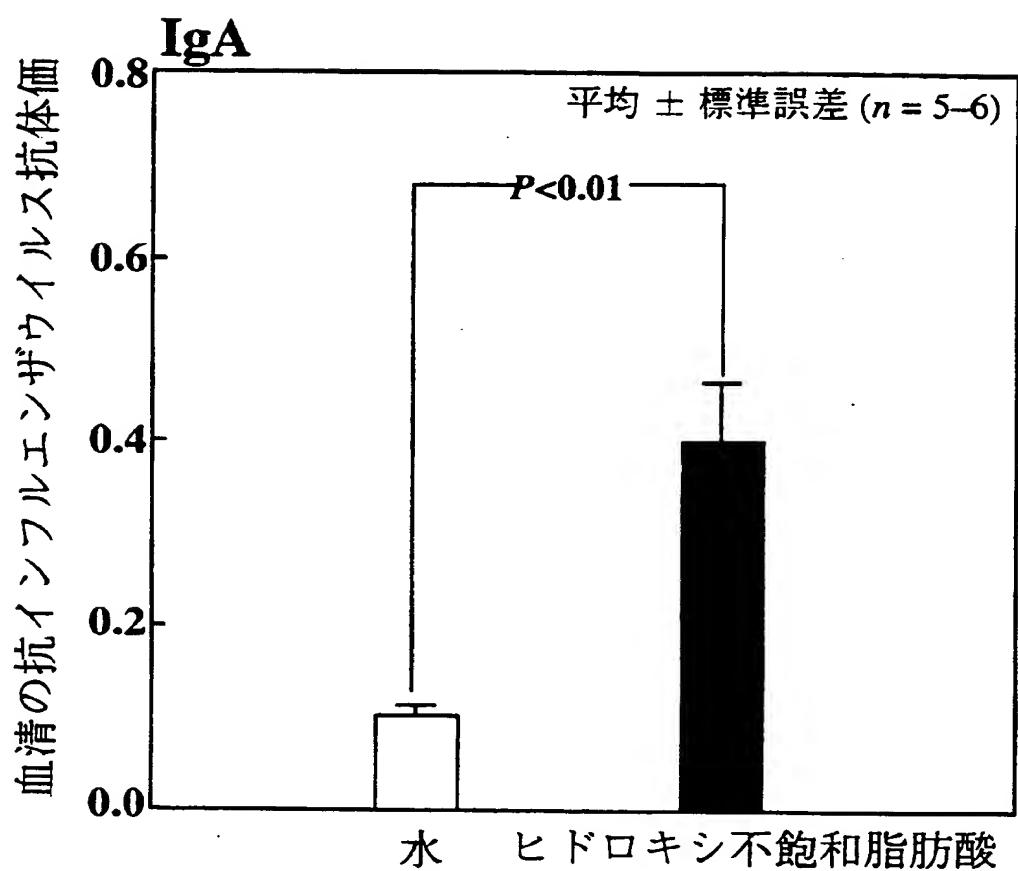




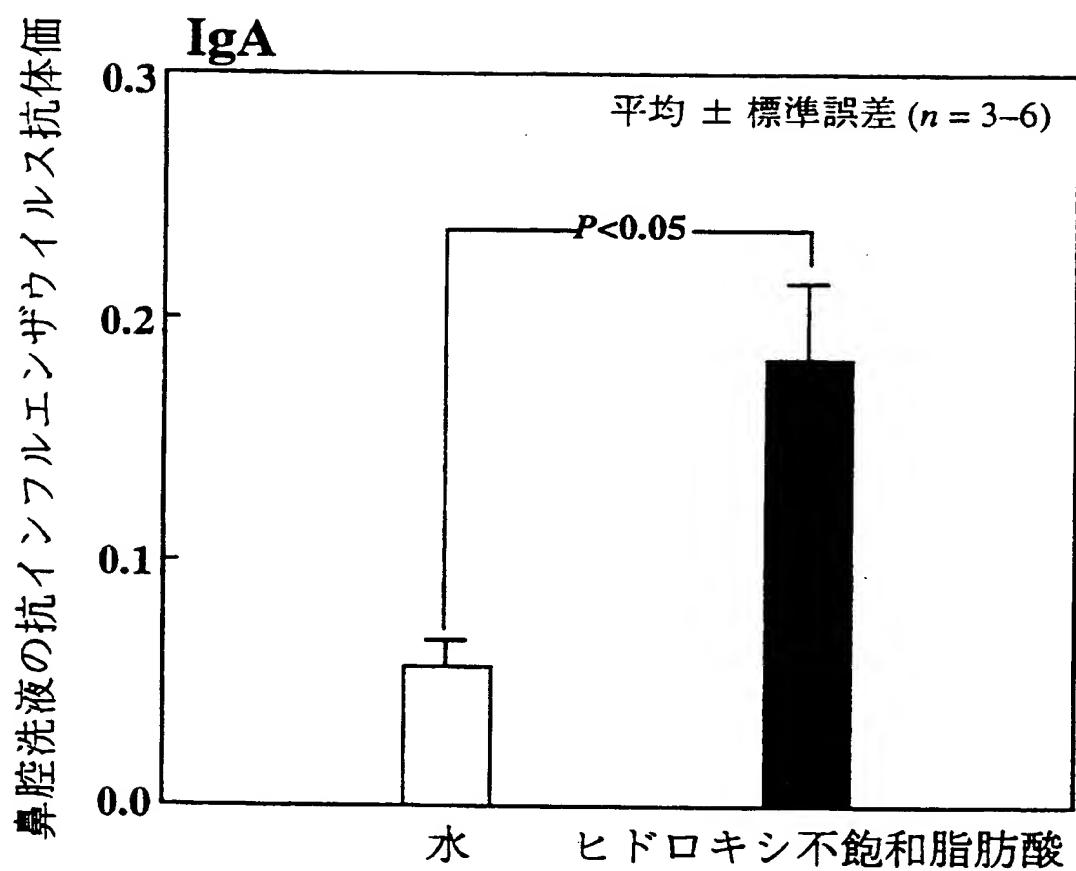
図 3





4 / 8

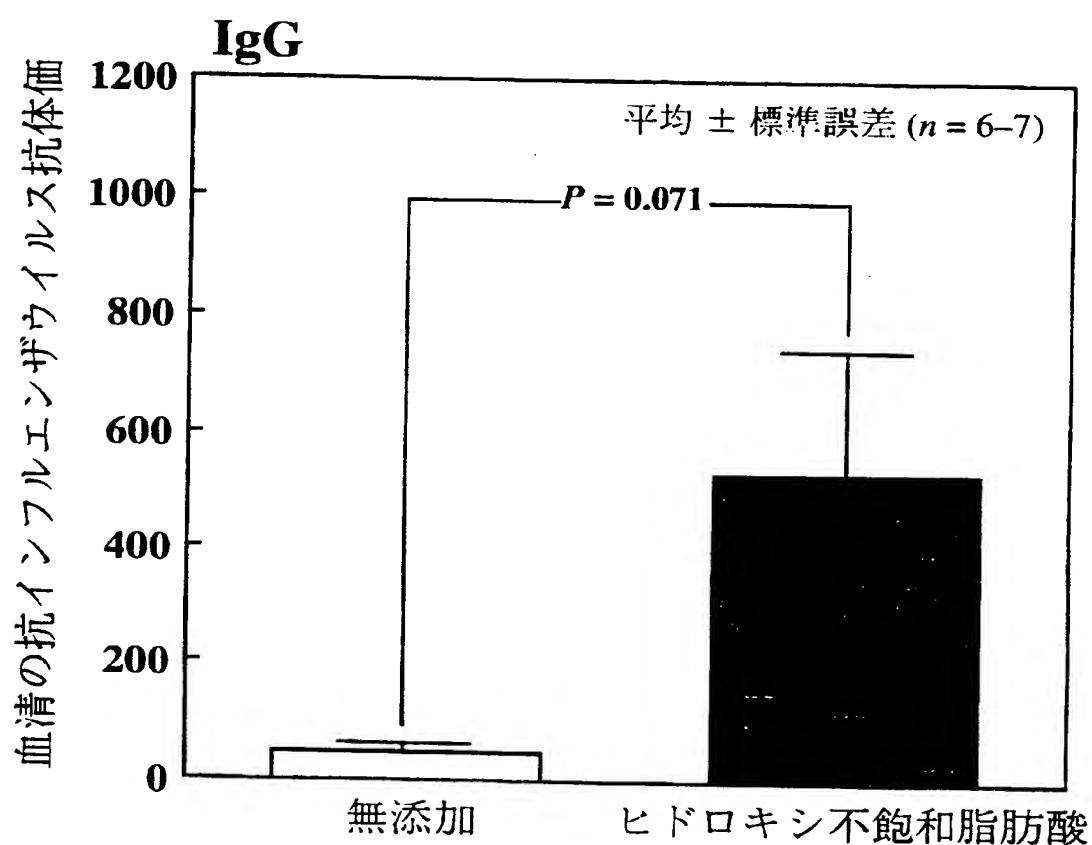
図 4

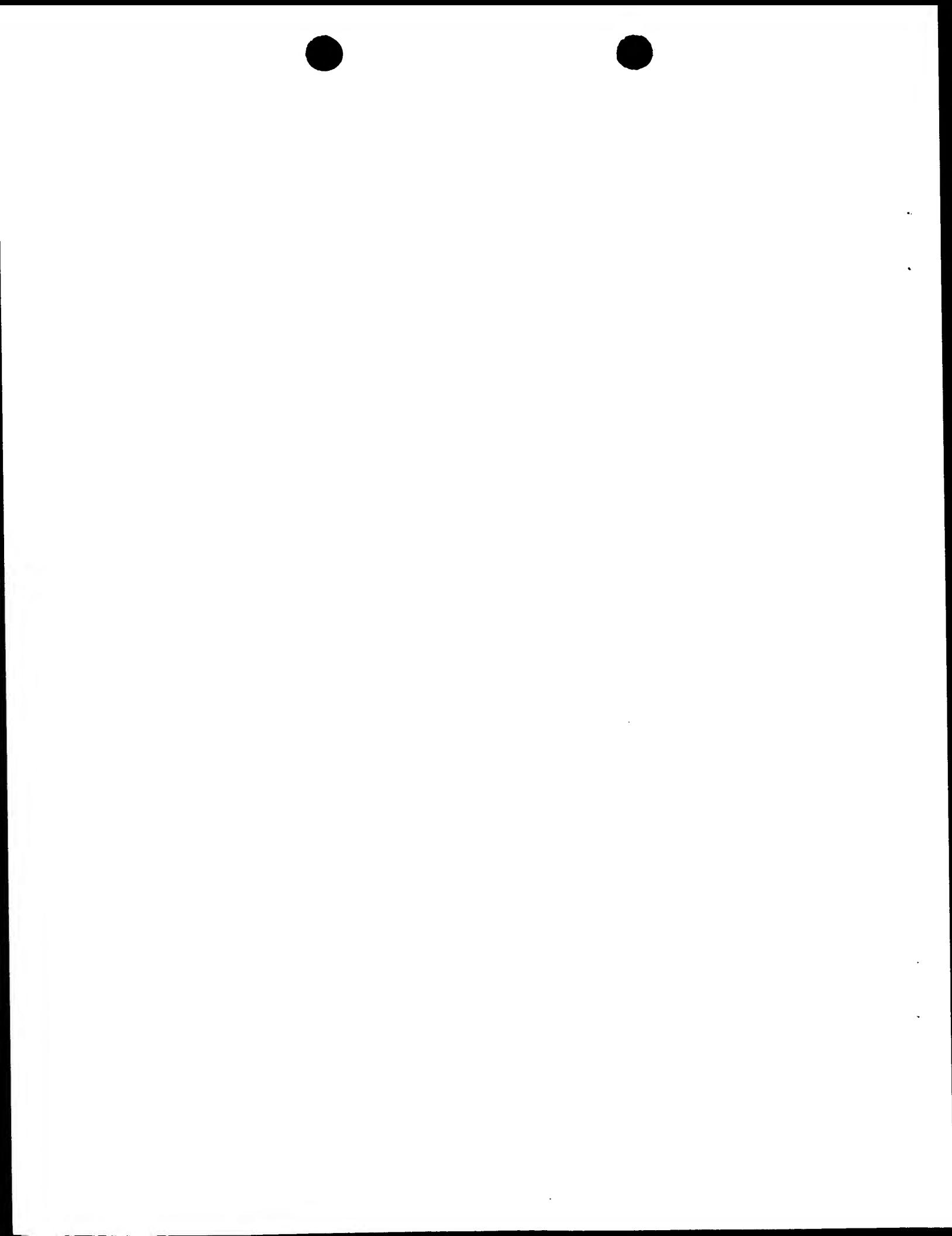




5 / 8

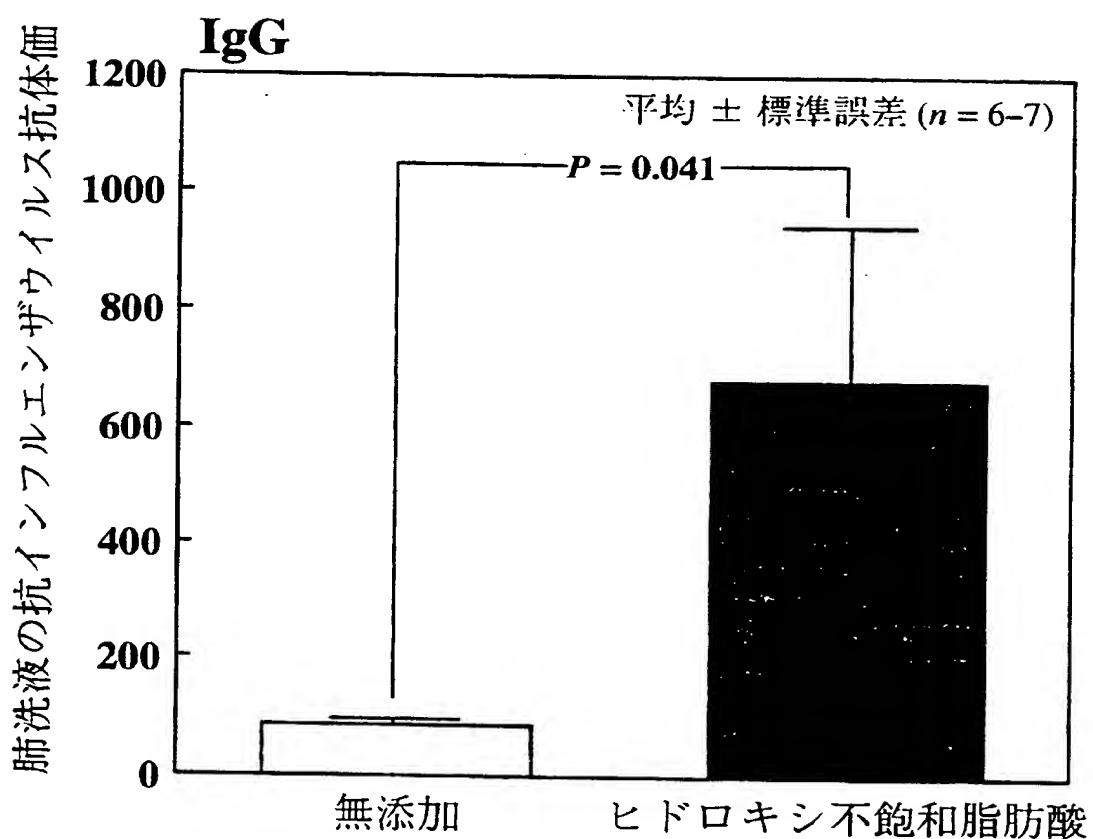
図 5





6 / 8

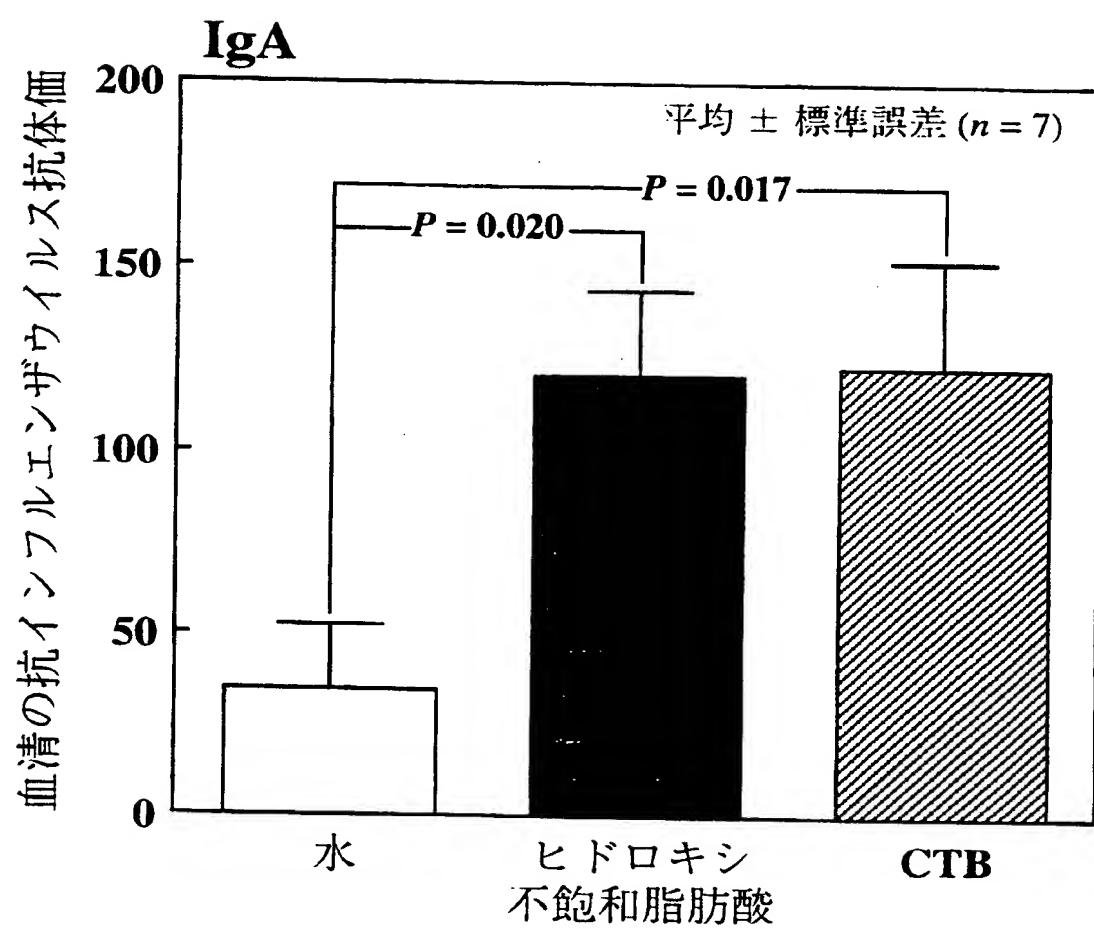
図 6





7 / 8

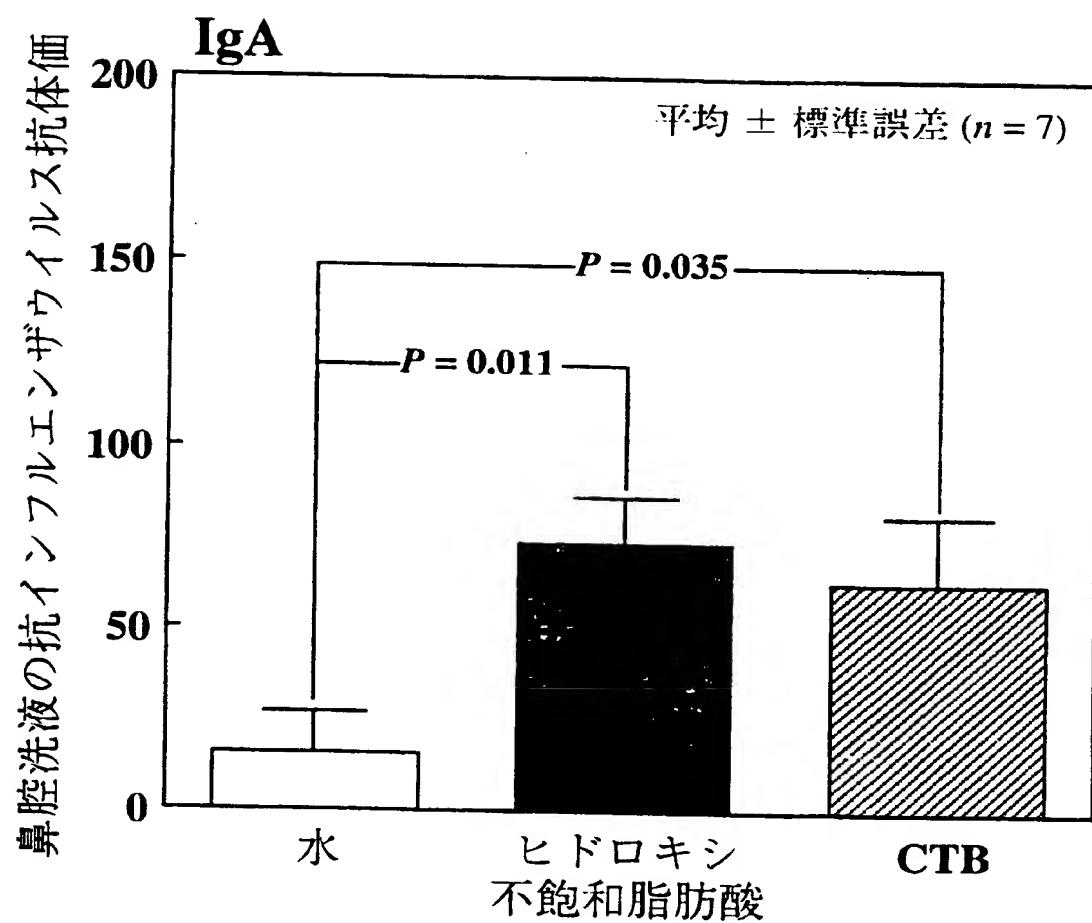
図 7

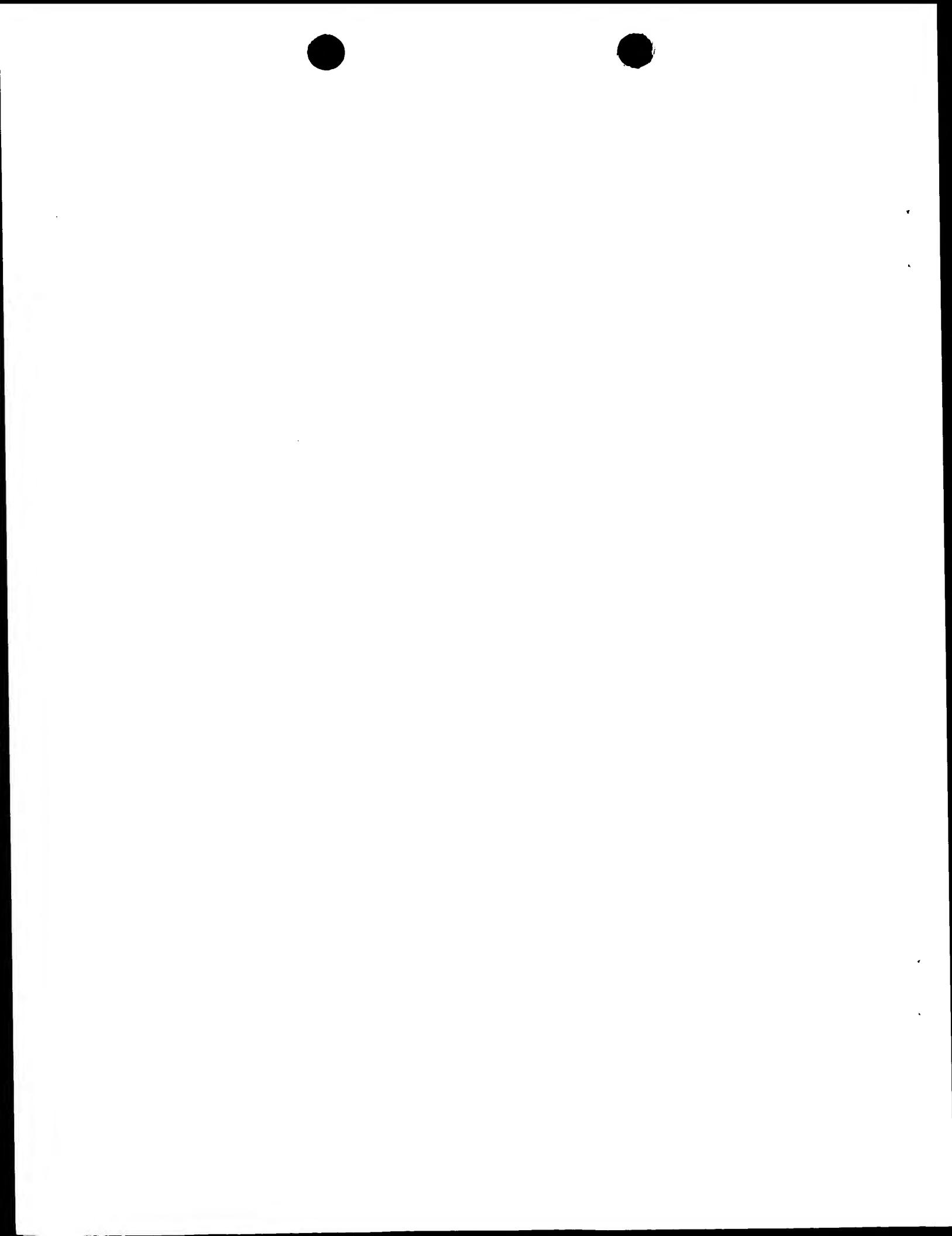




8 / 8

図 8





## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01289

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl<sup>7</sup> A61K39/39, 39/145, 39/15, 39-165, 39/21, 39/10, 39/05, 39/106, 39/108, 39/118, 39/00, 39/012, 39-015, A61P31/14, 31/16, 31/18, 31/20, 31/04, 33/06, 33/02, 33/12, 33/10, 33/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> A61K39/39, 39/145, 39/15, 39-165, 39/21, 39/10, 39/05, 39/106, 39/108, 39/118, 39/00, 39/012, 39-015, A61P31/14, 31/16, 31/18, 31/20, 31/04, 33/06, 33/02, 33/12, 33/10, 33/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), REGISTRY (STN), BIOSIS (STN), WPIL (QUESTEL)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO, 96/00609, A1 (SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES-SEPPIC), 24 October, 1996 (24.10.96), CLAIM 13; page 7, line 4 from the bottom to page 9, line 25; Esp. page 9, line 2 & FR, 2733151, A1 & EP, 825875, A1 & JP, 11-503743, A	1, 5-8
Y	JP, 7-173069, A (TSUMURA & CO.), 11 July, 1995 (11.07.95), Entire document (Family: none)	2-4
Y	YAMADA, Haruki et al., <i>In vivo</i> Antiinfluenza Virus Activity of Kampo Medicine Sho-Seiryu-To Through Mucosal Immune System, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1998, Vol. 20, No. 3, pp. 185-192, Entire document	2-4
Y	MARUNO, Masao, Research for active principles of <i>Pinelliae Tuber</i> and new preparation of crude drug, Journal of Traditional Medicines, 1997, Vol. 14, pp. 81-88, Esp. Abstract, Fig. 2	2-4

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
09 May, 2000 (09.05.00)

Date of mailing of the international search report  
23.05.00

Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/01289

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO, 96/06627, A1 (THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND), 07 March, 1996 (07.03.96), CLAIMS & US, 6019982, A & EP, 777490, A1 & JP, 10-505059, A	8
Y	JP, 5-9130, A (Takeda Chemical Industries, Ltd.), 19 January, 1993 (19.01.93), Claims; Par. No. [0002]	8

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/JP00/01289

**Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

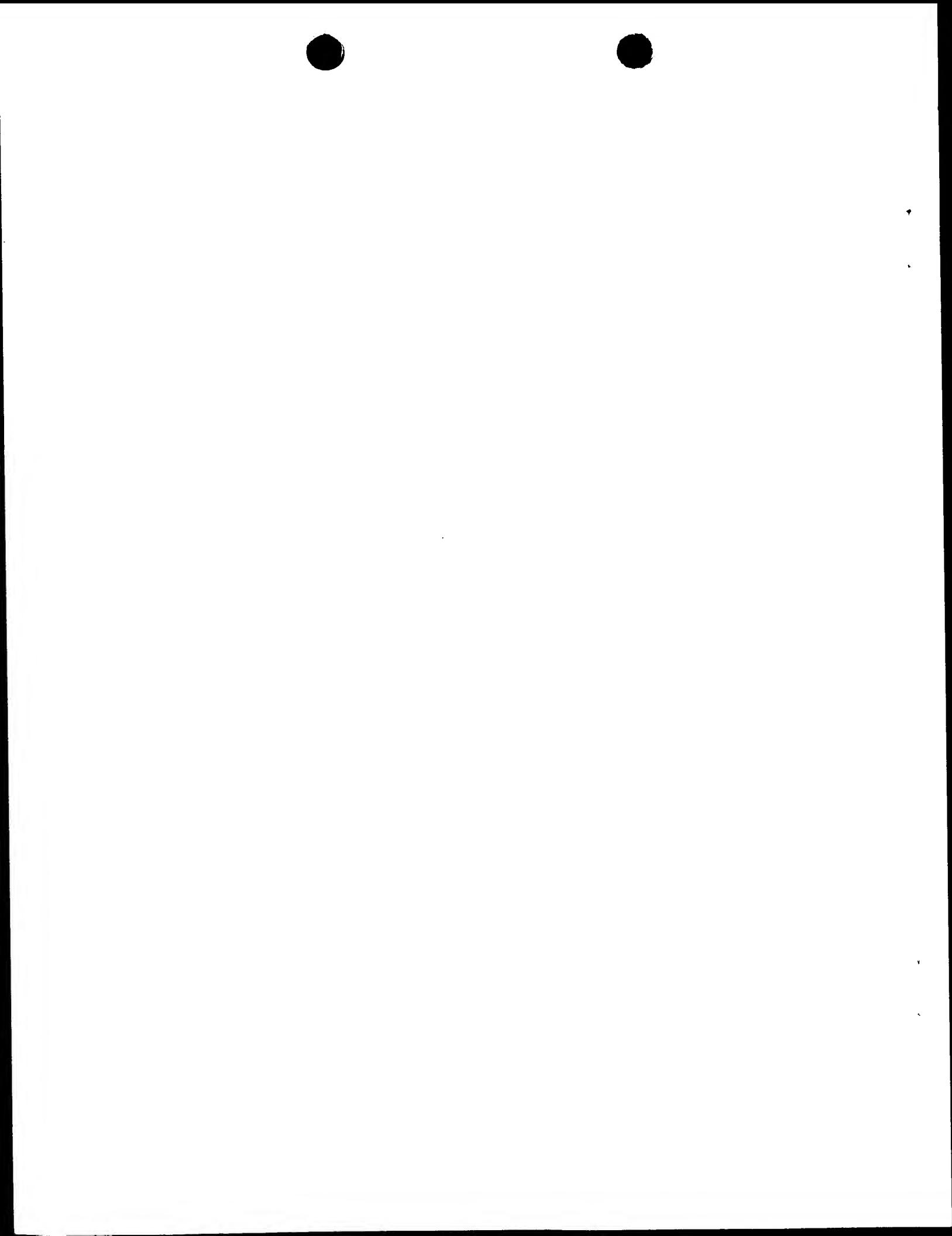
1.  Claims Nos.: 9,10  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
The subject matter of claims 9,10 relates to a method for treatment of the human body by therapy, which does not require an international search report by the International Search Authority in accordance with PCT Article 17(2)(a)(i) and Rule 39.1(iv).
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)**

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1.  As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2.  As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3.  As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**  The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.  
 No protest accompanied the payment of additional search fees.



## 国際調査報告

国際出願番号 PCT/JP00/01289

## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K39/39, 39/145, 39/15, 39-165, 39/21, 39/10, 39/05, 39/106, 39/108, 39/118, 39/00, 39/012, 39-015,  
A61P31/14, 31/16, 31/18, 31/20, 31/04, 33/06, 33/02, 33/12, 33/10, 33/00

## B. 調査を行った分野

## 調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl' A61K39/39, 39/145, 39/15, 39-165, 39/21, 39/10, 39/05, 39/106, 39/108, 39/118, 39/00, 39/012, 39-015,  
A61P31/14, 31/16, 31/18, 31/20, 31/04, 33/06, 33/02, 33/12, 33/10, 33/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CAPLUS (STN), MEDLINE (STN), EMBASE (STN), REGISTRY (STN),  
BIOSIS (STN), WPIL (QUESTEL)

## C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
X Y	WO, 96/00609, A1 (SOCIETE D'EXPLOITATION DE PRODUITS POUR LES INDUSTRIES CHIMIQUES-SEPPIC) 24. 10月. 1996 (24. 10. 96) CLAIM13, 第7ページ下から4 行-第9ページ第25行、特に、第9ページ第2行 & FR, 2733151, A1&EP, 825875, A1 & JP, 11-503743, A	1, 5-8 2-4
Y	JP, 7-173069, A (株式会社ツムラ) 11. 7月. 1995 (11. 07. 95) 文献全体 ファミリーなし	2-4

 C欄の続きにも文献が列挙されている。 パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示す  
もの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日  
以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行  
日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する  
文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

## の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって  
て出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理  
論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明  
の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以  
上の文献との、当業者にとって自明である組合せに  
よって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

09.05.00

国際調査報告の発送日

23.05.00

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

渡邉下告一

4C 9284

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) 関連すると認められる文献		関連する 請求の範囲の番号
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	
Y	YAMADA, Haruki et al, <i>In vivo</i> Antiinfluenza Virus Activity of Kampo Medicine Sho-Seiryu-To Through Mucosal Immune System, Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol., 1998, Vol. 20, No. 3, pp. 185-192, 文献全体	2-4
Y	MARUNO, Masao, Research for active principles of Pinelliae Tuber and new preparation of crude drug, Journal of Traditional Medicines, 1997, Vol. 14, pp. 81-88, 特にAbstract, Fig. 2	2-4
Y	WO, 96/06627, A1 (THE ADMINISTRATORS OF THE TULANE EDUCATIONAL FUND) 07. 3月. 1996 (07. 03. 96) CLAIMS &US, 6019982, A&EP, 777490, A1 &JP, 10-505059, A	8
Y	JP, 5-9130, A (武田薬品工業株式会社) 19. 1月. 1993 (19. 01. 93) 【特許請求の範囲】、【0002】	8

## 第I欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見 (第1ページの2の続き)

法第8条第3項 (PCT17条(2)(a)) の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1.  請求の範囲 9, 10 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。つまり、

請求の範囲 9, 10 は治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT17条(2)(a)(i)及びPCT規則39.1(iv)の規定により、この国際調査期間が調査をすることを要しない対象に係るものである。

2.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、

3.  請求の範囲 \_\_\_\_\_ は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

## 第II欄 発明の単一性が欠如しているときの意見 (第1ページの3の続き)

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

1.  出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。

2.  追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。

3.  出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。

4.  出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

## 追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。

追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

